



ប្រិយស្នា

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การแสดงออกของยีนสมาชิกกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* ของมันสำปะหลังในมันฝรั่ง

Expression of *AVP1 EXO* and *MRB1* Members from Cassava in Potato

นามผู้วิจัย นายไตรชาญ ปิยะอาภากร

๒ ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ยัยนดี ชาญวิวัฒนา, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ชัชวาล ภิรมจิตติ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อรรณพ ทีลาพร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อริณทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ສົບສິທິ **ມຫາວິທຍາລັຍເກຢຣາຢາສຳຄັນ**

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแสดงออกของยีนสมาชิกกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1*
ของมันสำปะหลังในมันฝรั่ง

Expression of *AVP1 EXO* and *MRB1* Members
from Cassava in Potato

โดย

นายไตรชาญ ปิยะอากาศ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไตรชาญ ปิยะภากร 2557: การแสดงออกของยีนสมาชิกกลุ่ม *AVPI EXO* และ *MRBI* ของ
มันสำปะหลังในมันฝรั่ง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์
ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชวัล จันทราสุริยรัตน์,
Ph.D. 184 หน้า

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) เป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย ซึ่ง
รากสะสมอาหารของมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญที่ไม่เพียงใช้เพื่อการบริโภคเท่านั้น แต่ยังมี
ความสำคัญในการเป็นวัตถุดิบสำหรับหลากหลายอุตสาหกรรม รวมถึงอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็น
พลังงานทดแทน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาในเครือข่ายพันธุกรรมที่ควบคุมการเจริญเติบโตของ
อวัยวะ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของฐานองค์ความรู้ของกลไกการควบคุมการสร้างรากสะสมอาหารในมันสำปะหลัง
สำหรับใช้เพื่อช่วยระบบการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีความโดดเด่นของผลผลิตรากสะสมอาหาร เพื่อ
รองรับกับความต้องการในการใช้ประโยชน์ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีเป้าหมายในกลุ่ม *AVPI EXO* และ
MRBI ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่มีรายงานถึงบทบาทต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช จากการศึกษาด้วยวิธีการสืบค้น
จากฐานข้อมูลจีโนม ร่วมกับการศึกษาแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการ และการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ทำ
ให้สามารถจำแนกยีนคู่เหมือนของยีน *AVPI EXO* และ *MRBI* ในจีโนมของมันสำปะหลังได้จำนวน 5 ยีนสำหรับ
กลุ่มยีน *AVPI* และ *EXO* และ 2 ยีนสำหรับกลุ่มยีน *MRBI* และจากการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนพบว่า
มีเพียง 2 ยีน สำหรับกลุ่มยีน *AVPI* (*MeAVPI_1* และ *MeAVPI_2*) และกลุ่มยีน *EXO* (*MeEXO1* และ *MeEXO3*)
และ 1 ยีนสำหรับกลุ่มยีน *MRBI* (*MeMRBI*) ที่มีการแสดงออกที่สอดคล้องกับบทบาทในระบบพัฒนาการของราก
สะสมอาหารมันสำปะหลัง ดังนั้นจึงได้ทำการสร้างพาหะเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนและถ่ายโอนยีนเหล่านี้
เข้าสู่ระบบมันฝรั่งเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนในกระบวนการเจริญเติบโตของอวัยวะสะสมอาหาร และทำการบ่งชี้ต้น
มันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซ่ รวมถึงศึกษาจำนวนชุดและการแสดงออกของยีนเป้าหมายในต้น
ดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยกรรมวิธี Southern blot และ semi-quantitative RT-PCR ตามลำดับ ซึ่งสามารถชักนำต้น
ดัดแปลงพันธุกรรม ตามที่ต้องการได้จำนวนหนึ่ง และเตรียมนำเข้าสู่การประเมินผลกระทบต่อนิโไทป์ โดยองค์
ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นส่วนหนึ่งที่สามารถทำให้นำไปสู่ความเข้าใจกระบวนการสร้างรากสะสมอาหาร
ของมันสำปะหลังได้อย่างถ่องแท้ในอนาคต

Trichan Piyaarphakorn 2014: Expression of *AVP1 EXO* and *MRB1* Members from Cassava in Potato.
Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor:
Assistant Professor Chatchawan Jantasuriyarat, Ph.D. 184 pages.

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) is an important economic crop of Thailand. It produces storage roots rich in carbohydrate in the form of starch which is widely exploited in many industrial purposes in addition to its use in human and animal consumption. Recently, cassava starch has also been the source for bioethanol production in the growing renewable energy industry. This study aimed to investigate genes in the network controlling organ growth as part of the attempt to gain an understanding of the genetics underlying storage root development in cassava. Such knowledge would be directly beneficial to the varietal improvement scheme to obtain high-yielding cassava cultivars to accommodate for the continuous rise in demands. The study focused on 3 groups of genes; *AVP1*, *EXO* and *MRB1*, whose role in organ development control has been well-documented. Genome database search and evolutionary analysis using phylogenetic trees constructed from amino acid alignment have allowed for the identification of 5 cassava members of the *AVP1* and *EXO* family and 2 members of the *MRB1* family. Further investigation by study of gene expression profiles has indicated 2 genes; *MeAVP1_1* & *MeAVP1_2* in the *AVP1* family, 2 genes; *MeEXO1* & *MeEXO3*, in the *EXO* family and 1 gene; *MeMRB1* in the *MRB1* family, which are likely to play role in cassava storage root growth. Consequently, overexpression constructs were made for these candidate genes and used in genetic transformation of potato to help assess their possible function in storage organ development. Potato transgenic lines were identified by PCR analysis and transgene copy number and expression then determined by Southern blot and semi-quantitative RT-PCR respectively. Evaluation of phenotypic consequences of transgene expression will be determined in these transgenic lines. The information obtained from this study would help strengthen the knowledge platform and lead to comprehensive understanding of the regulation of cassava storage root development in the future.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร.ยินดี ขาญวิวัฒนา ดร.ธราธร ทิรณจิตติ ดร.อรนุช ลีลาพร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สำหรับคำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ ในระหว่างการศึกษาวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอบพระคุณ ดร.จตุกร กุลอึ้ง ประธานกรรมการสอบปากเปล่าชั้นสุดท้าย และ ดร.ชนิต โชต ปิยพิทยานันต์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการสอบปากเปล่าชั้นสุดท้าย สำหรับคำแนะนำต่างๆ ที่มีคุณค่าอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณดร.โอภาส บุญเลี้ยงและเจ้าหน้าที่ภายในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองสำหรับตัวอย่าง มันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยในห้องปฏิบัติการที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ตลอดจนสมาชิกในห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือด้านกรรมวิธีการปฏิบัติงานด้านต่างๆ จนสามารถศึกษาวิจัยได้เป็นผลสำเร็จ

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนจาก โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ภายใต้สัญญาทุนเลขที่ TG-22-11-54-020M

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดาที่ได้อบรม และให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

ไตรชาญ ปิยะภากร

ตุลาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(18)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	38
อุปกรณ์	38
วิธีการ	39
ผลและวิจารณ์	72
ผล	72
วิจารณ์	133
สรุปและข้อเสนอแนะ	148
สรุป	148
ข้อเสนอแนะ	151
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	153
ภาคผนวก	169
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	184

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สายพันธุ์มันสำปะหลังไทยที่พัฒนาโดยกรรมวิธีผสมพันธุ์แบบมาตรฐานและลักษณะที่โดดเด่น	15
2 แสดงข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมาย	45
3 แสดงขั้นตอนดำเนินการกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนมันสำปะหลังเป้าหมาย	47
4 แสดงข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนแยกยีนเป้าหมายเพื่อใช้สำหรับสร้างพาหะการถ่ายโอนยีน	49
5 แสดงข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายที่อยู่ในต้น putative transgenic	64
6 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาสร้าง probe ตามวิธีการของ PCR DIG probe synthesis (Roche)	70
7 แสดงสมาชิกยีนกลุ่ม <i>AVP1 EXO</i> และ <i>MRB1</i> ที่สืบพบในฐานข้อมูลจีโนมของมันสำปะหลัง	73
8 แสดงผลวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีน (protein localization) ของยีน <i>MeEXO1 MeEXO2 MeEXO3 MeEXO4</i> และ <i>MeEXO5</i> ด้วยโปรแกรม ProtComp 9.0 (www.softberry.com) โดยคะแนนสูงสุดของโปรตีนเป้าหมายถูกแสดงด้วยอักษรสีแดง	83
9 แสดงสมาชิกยีนของมันสำปะหลังในกลุ่มยีน <i>AVP1 EXO</i> และ <i>MRB</i> ที่ถูกนำไปสู่กระบวนการถ่ายโอนยีน	96
10 แสดงโครงสร้างพลาสมิดทั้งหมดของกลุ่มยีนเป้าหมาย <i>MeAVP1 MeEXO</i> และ <i>MeMRB1</i> ที่ถ่ายโอนเข้าสู่มันฝรั่ง	116

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่

หน้า

- 11 แสดงผลสรุปจำนวน transgenic line ทั้งหมดของโครงสร้างพลาสมิดของยีน *MeAVP1_1* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S (pBI121:35S::*MeAVP1_1*; AQ-1) และภายใต้โปรโมเตอร์ patatin (pBI121:pat::*MeAVP1_1*; AQ-2) ซึ่งได้แสดงจำนวน line ย่อยของ transgenic line ที่ยังพบการมีอยู่ของยีนหลังผ่านการเปลี่ยนอาหาร รวมถึงสรุปผลการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน (copy number) และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน transgenic line 120
- 12 แสดงผลสรุปจำนวน transgenic line ทั้งหมดของโครงสร้างพลาสมิดของยีน *MeAVP1_2* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S (pBI121:35S::*MeAVP1_2*; AK-1) และภายใต้โปรโมเตอร์ patatin (pBI121:pat::*MeAVP1_2*; AK-2) ซึ่งได้แสดงจำนวน line ย่อยของ transgenic line ที่ยังพบการมีอยู่ของยีนหลังผ่านการเปลี่ยนอาหาร รวมถึงสรุปผลการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน (copy number) และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน transgenic line 121
- 13 แสดงผลสรุปจำนวน transgenic line ทั้งหมดของโครงสร้างพลาสมิดของยีน *MeEXO1* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S (pBI121:35S::*MeEXO1*; AR-1) และภายใต้โปรโมเตอร์ patatin (pBI121:pat::*MeEXO1*; AR-2) ซึ่งได้แสดงจำนวน line ย่อยของ transgenic line ที่ยังพบการมีอยู่ของยีนหลังผ่านการเปลี่ยนอาหาร รวมถึงสรุปผลการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน (copy number) และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน transgenic line 124
- 14 แสดงผลสรุปจำนวน transgenic line ทั้งหมดของโครงสร้างพลาสมิดของยีน *MeEXO3* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S (pBI121:35S::*MeEXO3*; AL-1) และภายใต้โปรโมเตอร์ patatin (pBI121:pat::*MeEXO3*; AL-2) ซึ่งได้แสดงจำนวน line ย่อยของ transgenic line ที่ยังพบการมีอยู่ของยีนหลังผ่านการเปลี่ยนอาหาร รวมถึงสรุปผลการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน (copy number) และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน transgenic line 125

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่

หน้า

- | | | |
|----|--|-----|
| 15 | แสดงผลสรุปจำนวน transgenic line ทั้งหมดของโครงสร้างพลาสมิดยีน <i>MeMRBI</i> ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S (pBI121:35S::MeMRBI; AM-1) และภายใต้โปรโมเตอร์ patatin (pBI121:pat:: MeMRBI; AM-2) ซึ่งได้แสดงจำนวน line ย่อยของ transgenic line ที่ยังพบการมีอยู่ของยีนหลังผ่านการเปลี่ยนอาหาร รวมถึงสรุปผลการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน (copy number) และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน transgenic line | 128 |
| 16 | แสดงผลสรุปจำนวนต้น putative transgenic และต้นตัดแปลงพันธุกรรม ทั้งหมดของแต่ละโครงสร้างพลาสมิดของยีนมันสำปะหลังเป้าหมาย | 130 |

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	แสดงระบบรากของมันสำปะหลังที่งอกจากเมล็ด และรากที่พัฒนาจากท่อนพันธุ์
ก)	ภาพแสดงการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังที่พัฒนามาจากเมล็ดซึ่งจะมีการพัฒนาของระบบรากแก้ว และรากแขนง (primary root และ secondary root) จากนั้นจึงมีการพัฒนาของรากพิเศษ (adventitious root) เป็นระบบรากฝอยเพื่อพัฒนาเป็นรากสะสมอาหารต่อไป ส่วนของใบจะมีโครงสร้างของใบแรกเกิด (cotyledon) ที่งอกออกมาจากเมล็ด และมีการพัฒนาของใบแท้ภายหลัง (true leaf)
2	แสดงเนื้อเยื่อชั้นต่างๆของรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง
3	แผนภูมิเส้นแสดงปริมาณผลผลิตเฉลี่ยของมันสำปะหลังจากทั่วโลกตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2546-2556
4	แสดงการเปรียบเทียบผลผลิตของมันสำปะหลังแต่ละทวีป และผลผลิตใน 5 อันดับประเทศที่มีผลผลิตสูงสุด ก) แผนภูมิวงกลมแสดงอัตราส่วนผลผลิตของมันสำปะหลังในแต่ละทวีปในปีพุทธศักราช 2556 ประกอบด้วย แอฟริกา (สีน้ำเงิน) เอเชีย (สีเหลือง) อเมริกา (สีแดง) และโอเชียเนีย (สีเขียว) ข) แผนภูมิแท่งแสดงอันดับประเทศที่มีผลผลิตของมันสำปะหลังสูงสุดในปีพุทธศักราช 2556 ประกอบด้วยประเทศไนจีเรีย ไทย อินโดนีเซีย บราซิล และสาธารณรัฐประชาธิปไตยคองโก
5	แผนภูมิแสดงอัตราส่วนการส่งออกและการใช้ในประเทศของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปมันสำปะหลังในประเทศไทย ซึ่งประกอบไปด้วยเอทานอล (สีน้ำเงิน) แป้งมันสำปะหลัง (สีส้มและสีเหลือง) และมันอัดเม็ด (สีเขียวแก่และสีเขียวอ่อน)
6	แสดงกลไกการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชผ่านกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์พืช ประกอบด้วย การส่งสัญญาณผ่านฮอร์โมนพืช กระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสของยีน รวมถึงกระบวนการ post-translational modification ของโปรตีน ทำให้เกิดกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลล์คือกระบวนการแบ่งเซลล์ กระบวนการขยายเซลล์ และกระบวนการขยายของผนังเซลล์ทำให้เกิดการเจริญเติบโตและขยายขนาดของอวัยวะพืช

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
7 แสดงโครงข่ายของกลุ่มยีน IYGs ที่สัมพันธ์กับกลไกการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยลูกศรสีเขียวแสดงการกระตุ้นกลไกเป้าหมาย ลูกศรสีชมพูแสดงการยับยั้งกลไกเป้าหมาย ในส่วนของวงกลมสีเขียวแสดงฮอร์โมนพืชที่มีส่วนควบคุมขนาดวัยจะประกอบไปด้วยฮอร์โมนออกซิน (auxin) จิบเบอเรลลิน (gibberellin; GA) ไซโตไคนิน (cytokinin; CK) กรดแอบไซซิก (abscisic acid; ABA) บราสสิโนสเตอรอยด์ (brassinosteroid; BR) กรดจัสโมนิก (jasmonic acid; MeJA) และกรดซาลิไซลิก (salicylic acid; SA)	24
8 แสดงตำแหน่งของโปรตีนขนส่งโปรตอนในเซลล์พืช ประกอบด้วยโปรตีน P-type H^+ -ATPase แสดงในวงรีสีน้ำเงินเข้ม โปรตีน V-type H^+ -ATPase แสดงในวงรีสีชมพู และโปรตีน V-type H^+ -PPase แสดงในวงรีสีส้ม	26
9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร Brassinolide ซึ่งเป็นหนึ่งในสารกลุ่ม Brassinosteroids (BRs) ที่ถูกค้นพบครั้งแรก	28
10 แสดงกระบวนการส่งสัญญาณของ brassinosteroid (brassinosteroid signal transduction) ภายในเซลล์พืช ซึ่งกลไกการส่งสัญญาณจะเริ่มจากการจับกันของ brassinosteroid (BR; วงกลมสีเขียวเข้ม) กับโปรตีน BRI1 (รูปสีน้ำเงินเข้ม) ทำให้เกิดกระบวนการส่งสัญญาณต่างๆภายในเซลล์ประกอบไปด้วยโปรตีน BSK1 (วงรีสีม่วง) โปรตีน BSU1 (สี่เหลี่ยมสีเขียวอ่อน) โปรตีน BIN2 (สี่เหลี่ยมสีชมพู) และโปรตีน BZR1 (วงกลมสีส้ม) ซึ่งในการส่งสัญญาณจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมหมู่ phosphate (วงกลมสีเหลือง) ในโปรตีนบางตัวเพื่อควบคุมการทำงาน โดยกลไกที่เกิดจากการกระตุ้นของ brassinosteroids ถูกแสดงในลูกศรทึบ ส่วนกลไกที่เกิดจากสถานะไม่มี brassinosteroids ถูกแสดงในลูกศรประ	30

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
11	แผนภาพแสดงโครงสร้างของ Tumor-inducing plasmid (Ti-plasmid) ที่พบอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย <i>A. tumefaciens</i> ซึ่งสามารถที่จะถ่ายโอนส่วนของ T-DNA (บริเวณเส้นสีฟ้า) เข้าสู่พืช องค์ประกอบของ Ti-plasmid ประกอบด้วย origin of replication (Ori; แถบสีฟ้า) opine catabolism (แถบสีเหลือง) ยีน virulence (แถบสีแดง) left border และ right border (LB และ RB; แถบสีชมพู) ยีน oncogenic (แถบสีส้ม) และยีน Opine synthesis (แถบสีเขียว)	35
12	แผนภาพแสดงกลไกการถ่ายโอน T-DNA จากแบคทีเรีย <i>A. tumefaciens</i> เข้าสู่เซลล์พืชผ่านกลไกการทำงานของโปรตีน Vir ของ แบคทีเรีย <i>A. tumefaciens</i>	36
13	แสดงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยเนื้อเยื่อส่วนยอด (shoot apex; AP) ใบอ่อน (young leaf; YL) ใบแก่ (mature leaf; ML) และลำต้นส่วนบน (top stem; TS) เนื้อเยื่อส่วนรากฝอย (fibrous root; Fi) รากที่เริ่มมีการโป่งพองระดับที่ 1 ระดับที่ 2 (transition root; TR1 และ TR2) และ รากสะสมอาหาร (storage root; SR) ซึ่งการเก็บตัวอย่างของรากสะสมอาหารจะเก็บแยกตามอายุ 2 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือน	41
14	แสดงแผนภาพของพลาสมิด pGEM®-T Easy vector (Promega)	51
15	แสดงแผนภาพของโครงสร้างพลาสมิด pBI121 สองชนิด คือโครงสร้างพลาสมิดที่ยีนเป้าหมาย (GOI; ลูกศรสีชมพู) อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV (ลูกศรสีฟ้า) และชนิดที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ patatin (ลูกศรสีเขียวเข้ม) โดยโครงสร้างพลาสมิดทั้ง 2 ชนิดมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ kanamycin (<i>nptII</i> ; ลูกศรสีส้ม) ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ NOS (ลูกศรสีเขียวอ่อน) ส่วนของกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงแสดงตำแหน่งของ Nos terminator ที่ใช้หยุดกระบวนการ transcription ของยีนเป้าหมาย และยีน <i>nptII</i> และลูกศรสีม่วงแสดงขอบเขตของ left border และ right border ซึ่งเป็นขอบเขตที่บ่งบอกว่าโครงสร้างบริเวณที่อยู่ในขอบเขตนี้จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่พืช	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
16	แสดงแผนภูมิตำแหน่งของไพรเมอร์คู่ที่หนึ่ง (1 st pair) และคู่ที่สองที่ (2 nd pair) ที่ใช้ในกระบวนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายในต้น putative transgenic บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนของยีนเป้าหมาย (GOI; ลูกศรสีชมพู) โปรโมเตอร์ 35S CaMV หรือ patatin (ลูกศรสีฟ้า) ยีน <i>nptII</i> (ลูกศรสีส้ม) โปรโมเตอร์ NOS (ลูกศรสีเขียว) Nos terminator (กรอบสี่เหลี่ยมสีแดง) และส่วนของ left border และ right border (ลูกศรสีม่วง)	66
17	แสดงการเตรียมอุปกรณ์สำหรับถ่ายโอนดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรสสู่แผ่นเมมเบรนในการวิเคราะห์จำนวนชุดของยีนด้วยกรรมวิธี Southern blot	70
18	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนกลุ่ม AVP1 ในมันสำปะหลังประกอบด้วยโปรตีน MeAVP1_1 MeAVP1_2 MeAVP1_3 MeAVP1_4 และ MeAVP1_5 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AtAVP1 จากพืชแม่แบบ <i>Arabidopsis</i> และโปรตีน AVP1 ในสิ่งมีชีวิตอื่น (Os = <i>Oryza sativa</i> และ Vv = <i>Vitis vinifera</i>) โดยบริเวณอนุรักษ์ที่คาดว่าเป็นตำแหน่ง putative PPi binding domain ถูกเน้นด้วยสีชมพู และตำแหน่ง putative H ⁺ translocation domain ถูกเน้นด้วยสีม่วง	75
19	แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของยีนกลุ่ม AVP ของมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับยีนพืชแม่แบบ <i>AtAVP1</i> ใน <i>Arabidopsis</i> และยีนที่ใกล้เคียงกันในพืชอื่น โดยแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Type I และ Type II กลุ่มยีนของมันสำปะหลังที่อยู่ในกลุ่ม Type I ถูกแสดงด้วยอักษรแดง ส่วนกลุ่มยีนที่อยู่ในกลุ่ม Type II ถูกแสดงด้วยอักษรสีน้ำเงิน	77
20	แสดงผลการจำลองโครงสร้างโปรตีนที่เป็น transmembrane protein ด้วยโปรแกรม TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) สำหรับโปรตีนจากยีนเป้าหมายในมันสำปะหลัง 5 ยีนประกอบด้วยยีน <i>MeAVP1_1</i> <i>MeAVP1_2</i> <i>MeAVP1_3</i> <i>MeAVP1_4</i> และ <i>MeAVP1_5</i> โดยโปรตีนส่วนที่เป็น transmembrane domain ถูกแสดงในแถบสี่เหลี่ยมสีแดง ส่วนที่อยู่ภายใน (inside) และภายนอก (outside) เชื้อหุ้มเซลล์ ถูกแสดงด้วยเส้นสีน้ำเงินและสีชมพูตามลำดับ	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	เนื้อหา	หน้า
21	แสดงการเปรียบเทียบแบบจำลองของ transmembrane protein ของโปรตีนจากยีนเป้าหมายในมันสำปะหลัง <i>MeAVP1_1</i> <i>MeAVP1_2</i> <i>MeAVP1_3</i> <i>MeAVP1_4</i> และ <i>MeAVP1_5</i> กับโปรตีนจากยีนแม่แบบ <i>AtAVP1</i> และยีนอื่นที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล NCBI โดยโปรตีนส่วนที่เป็น transmembrane domain ถูกแสดงในแถบสีเหลี่ยมสีแดง ส่วนที่อยู่ภายใน (inside) และภายนอก (outside) เยื่อหุ้มเซลล์ ถูกแสดงด้วยเส้นสีน้ำเงินและสีชมพูตามลำดับ	79
22	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EXO ในมันสำปะหลัง ประกอบด้วยโปรตีน MeEXO1 MeEXO2 MeEXO3 MeEXO4 และ MeEXO5 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AtEXO จากพืชแม่แบบ <i>Arabidopsis</i> ซึ่งบริเวณอนุรักษ์ถูกเน้นด้วยแถบสีส้มเหลือง และตำแหน่งที่คาดว่าเป็น cleavable N-terminal signal sequence ถูกเน้นด้วยแถบสีเขียว	81
23	แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของยีนกลุ่ม EXO ของมันสำปะหลัง เปรียบเทียบกับพืชแม่แบบ <i>AtEXO</i> (ตัวอักษรสีเขียว) และยีนที่ใกล้เคียงกันในพืชอื่นจากฐานข้อมูล NCBI โดยยีนจากมันสำปะหลังที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับยีน <i>AtEXO</i> ถูกแสดงด้วยตัวอักษรสีชมพู	82
24	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน MRB1 ในมันสำปะหลัง ประกอบด้วยโปรตีน MeMRB1_1 และ MeMRB1_2 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AtMRB1 จากพืชแม่แบบ <i>Arabidopsis</i> ซึ่งบริเวณอนุรักษ์ถูกเน้นด้วยแถบสีเขียว	84
25	แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของยีนกลุ่ม MRB1 ของมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับพืชแม่แบบ <i>AtMRB1</i> (ตัวอักษรสีเขียว) และยีนที่ใกล้เคียงกันในพืชอื่นจากฐานข้อมูล NCBI โดยยีนจากมันสำปะหลังที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับยีน <i>AtMRB1</i> ถูกแสดงด้วยตัวอักษรสีม่วง	85

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

26

แสดงผลการจำลองโครงสร้างโปรตีนที่เป็น transmembrane protein ด้วยโปรแกรม TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) ของโปรตีนจากยีน *MRB1* ในมันสำปะหลัง 2 ยีนประกอบด้วยยีน *MeMRB1_1* และยีน *MeMRB1_2* เปรียบเทียบกับโครงสร้างโปรตีนจากยีนแม่แบบ *AtMRB1* โดยส่วนที่เป็น transmembrane domain จะแสดงในแถบสีเหลี่ยมสีแดง ส่วนที่อยู่ภายใน (inside) และภายนอก (outside) เยื่อหุ้มเซลล์ จะถูกแสดงด้วยเส้นสีน้ำเงินและสีชมพูตามลำดับ

86

27

ภาพการทำ denaturing gel electrophoresis ของ RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมันสำปะหลังประกอบด้วย ส่วนยอด (AP), ใบอ่อน (YL), ใบแก่ (ML), ลำต้นส่วนบน (TS), รากฝอย (Fi), รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1, 2 (TR1, TR2), รากสะสมอาหาร (SR), เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (SR-Cortex) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (SR- parenchyma)

88

28

ผลเจลอเล็กโตรโฟเรซิสของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeAVP1_1*, *MeAVP1_2* *MeAVP1_3* *MeAVP1_4* และ *MeAVP1_5* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP), ใบอ่อน (YL), ใบแก่ (ML), ลำต้นส่วนบน (TS), รากฝอย (Fi), รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1, 2 (TR1, TR2), รากสะสมอาหาร (2SR), เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (2SRC) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (2SRP) ที่อายุ 2 เดือน

88

29

แสดงผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* ก) กราฟแสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *MeAVP1_1* (สีน้ำเงิน) และ *MeAVP1_2* (สีชมพู) ข) ผลเจลอเล็กโตรโฟเรซิสของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP) ใบอ่อน (YL) ใบแก่ (ML) ลำต้นส่วนบน (TS) รากฝอย (Fi) รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1, 2 (TR1, TR2) รากสะสมอาหาร (SR) เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (SRC) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (SRP) ที่อายุ 2 เดือน (2M) 3 เดือน (3M) และ 6 เดือน (6M)

90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 30 ผลเจลอิลีกโตโรโพริซิชของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeEXO1*, *MeEXO2*, *MeEXO3*, *MeEXO4* และ *MeEXO5* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP) ใบอ่อน (YL) ใบแก่ (ML) ลำต้นส่วนบน (TS) รากฝอย (Fi) รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1 2 (TR1 TR2) รากสะสมอาหาร (2SR) เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (2SRC) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (2SRP) ที่อายุ 2 เดือน และรากสะสมอาหารที่อายุ 3 เดือน (3SR) และ 6 เดือน (6SR) 92
- 31 แสดงผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* ก) กราฟแสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *MeEXO1* (สีเขียว) และ *MeEXO3* (สีเหลือง) ข) ผลเจลอิลีกโตโรโพริซิชของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP) ใบอ่อน (YL) ใบแก่ (ML) ลำต้นส่วนบน (TS) รากฝอย (Fi) รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1, 2 (TR1, TR2) รากสะสมอาหาร (SR) เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (SRC) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (SRP) ที่อายุ 2 เดือน (2M) 3 เดือน (3M) และ 6 เดือน (6M) 93
- 32 ผลเจลอิลีกโตโรโพริซิชของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeMRB1_1* และ *MeMRB1_2* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP) ใบอ่อน (YL) ใบแก่ (ML) ลำต้นส่วนบน (TS) รากฝอย (Fi) รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1 2 (TR1 TR2) รากสะสมอาหาร (2SR) เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (2SRC) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (2SRP) ที่อายุ 2 เดือน 94

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 33 แสดงผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีน *MeMRBI_1* ก) กราฟแสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *MeMRBI_1* ข) ผลเจลอิเล็กโตรโฟริซิสของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeMRBI_1* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของ มันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP) ใบอ่อน (YL) ใบแก่ (ML) ลำต้นส่วนบน (TS) รากฝอย (Fi) รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1, 2 (TR1, TR2) รากสะสมอาหาร (SR) เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (SRC) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (SRP) ที่อายุ 2 เดือน (2M) 3 เดือน (3M) และ 6 เดือน (6M) 95
- 34 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeAVP1_1* (cassava4.1_002124m.g) จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_1-BamHI-F และ MeAVP1_1-SacI-R รวมทั้งขนาดที่คาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ซึ่งอยู่ที่ 2,575 bp โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_1-BamHI-F ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีชมพู และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_1-SacI-R ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีม่วง ส่วนกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวแสดงบริเวณที่เป็น 5' UTR ของยีน กรอบสีฟ้าแสดงบริเวณยีนที่จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และกรอบสีส้มแสดงบริเวณที่เป็น 3'UTR ของยีน ซึ่งระบุความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวที่ 107 bp 2,310 bp และ 334 bp ตามลำดับ 98
- 35 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeAVP1_2* (cassava4.1_002160m.g) จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_2-BamHI-F และ MeAVP1_2-SacI-R รวมทั้งขนาดที่คาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ซึ่งอยู่ที่ 2,540 bp โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_2-BamHI-F แสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีน้ำเงิน และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_2-SacI-R แสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีแดง ส่วนกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวแสดงบริเวณที่เป็น 5' UTR ของยีน กรอบสีฟ้าแสดงบริเวณยีนที่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และกรอบสีส้มแสดงบริเวณที่เป็น 3'UTR ของยีน ซึ่งระบุความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวที่ 132 bp 2,274 bp และ 266 bp ตามลำดับ 99

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
36 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ที่ได้จากการแยกแอมป์เอ็นเอของยีน <i>MeAVP1_1</i> (ก) และ <i>MeAVP1_2</i> (ข) ด้วยคูโพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่กับแอมป์เอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ยีน อยู่ที่ประมาณ 2,500 bp	100
37 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ที่ได้จากการวิธี colony PCR ของยีน <i>MeAVP1_1</i> (ก) จำนวน 15 โคลน และ <i>MeAVP1_2</i> (ข) จำนวน 10 โคลน ด้วยคูโพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ยีน อยู่ที่ประมาณ 2,500 bp	101
38 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน <i>MeAVP1_1</i> (ก) ภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I ของยีน <i>MeAVP1_1</i> แบบไม่สมบูรณ์ เปรียบเทียบขนาดของแอมป์เอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของยีนอยู่ที่ประมาณ 2,500 bp ข) แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I บนพลาสมิด pGEM®-T easy (เส้นสีฟ้า) ที่ต่อกับยีน <i>MeAVP1_1</i> (เส้นสีชมพู)	102
39 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน <i>MeAVP1_2</i> (ก) ภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I ของยีน <i>MeAVP1_2</i> เปรียบเทียบขนาดของแอมป์เอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของยีนอยู่ที่ประมาณ 2,500 bp ข) แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I บนพลาสมิด pGEM®-T easy (เส้นสีฟ้า) ที่ต่อกับยีน <i>MeAVP1_2</i> (เส้นสีเขียว)	103
40 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากพลาสมิดของ <i>Agrobacterium</i> ที่มียีนเป้าหมาย <i>MeAVP1_1</i> (ก) และ <i>MeAVP1_2</i> (ข) เชื่อมต่อกับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S และ patatin (Pat) เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ยีน อยู่ที่ประมาณ 2,500 bp	104

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 41 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeEXO1* (cassava4.1_012048m.g) จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง และตำแหน่งของไพรเมอร์ *MeEXO1-BamHI-F* และ *MeEXO1-SacI-R* รวมทั้งขนาดที่คาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ซึ่งอยู่ที่ 1,061 bp โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ *MeEXO1-BamHI-F* ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีแดง และตำแหน่งของไพรเมอร์ *MeEXO1-SacI-R* ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีม่วง ส่วนกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวแสดงบริเวณที่เป็น 5' UTR ของยีน กรอบสีเหลืองแสดงบริเวณยีนที่จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และกรอบสีฟ้าแสดงบริเวณที่เป็น 3'UTR ของยีน ซึ่งระบุความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวที่ 78 bp 957 bp และ 188 bp ตามลำดับ 105
- 42 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeEXO3* (cassava4.1_011938m.g) จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง และตำแหน่งของไพรเมอร์ *MeEXO3-BamHI-F* และ *MeEXO3-SacI-R* รวมทั้งขนาดที่คาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ซึ่งอยู่ที่ 1,084 bp โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ *MeEXO3-BamHI-F* ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีน้ำเงิน และตำแหน่งของไพรเมอร์ *MeEXO3-SacI-R* ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีส้ม ส่วนกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวแสดงบริเวณที่เป็น 5' UTR ของยีน กรอบสีเหลืองแสดงบริเวณยีนที่จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และกรอบสีฟ้าแสดงบริเวณที่เป็น 3'UTR ของยีน ซึ่งระบุความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวที่ 58 bp 966 bp และ 166 bp ตามลำดับ 106
- 43 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ส ที่ได้จากการแยกแอมป์ลิฟิเคชันของยีน *MeEXO1* (ก) และ *MeEXO3* (ข) ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่กับแอมป์ลิฟิเคชันมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ยีน อยู่ที่ประมาณ 1,100 bp 107

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
44 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน <i>MeEXO1</i> ก) ภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I ของยีน <i>MeEXO1</i> แบบไม่สมบูรณ์ เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของยีนอยู่ที่ประมาณ 1,100 bp ข) แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดเอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I บนพลาสมิด pGEM [®] -T easy (เส้นสีเหลือง) ที่ต่อกับยีน <i>MeEXO1</i> (เส้นสีฟ้า)	108
45 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน <i>MeEXO3</i> ก) ภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I ของยีน <i>MeEXO3</i> เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของยีนอยู่ที่ประมาณ 1,100 bp ข) แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดเอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I บนพลาสมิด pGEM [®] -T easy (เส้นสีเหลือง) ที่ต่อกับยีน <i>MeEXO3</i> (เส้นสีเขียว)	109
46 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์สที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากพลาสมิดของ <i>Agrobacterium</i> ที่มียีนเป้าหมาย <i>MeEXO1</i> (ก) และ <i>MeEXO3</i> (ข) เชื่อมต่อกับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S และ patatin (Pat) ทำการเปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ยีน อยู่ที่ประมาณ 1,100 bp	110
47 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>MeMRB1</i> (cassava4.1_007974m.g) จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง และตำแหน่งของไพรเมอร์ <i>MeMRB1-Bam</i> HI-F และ <i>MeMRB1-Sac</i> I-R รวมทั้งขนาดที่คาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ซึ่งอยู่ที่ 1,394 bp โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ <i>MeMRB1-Bam</i> HI-F ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีฟ้า และตำแหน่งของไพรเมอร์ <i>MeMRB1-Sac</i> I-R ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีส้ม ส่วนกรอบสี่เหลี่ยมสีชมพูแสดงบริเวณที่เป็น 5' UTR ของยีน กรอบสีเขียวแสดงบริเวณยีนที่จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และกรอบสีเหลืองแสดงบริเวณที่เป็น 3'UTR ของยีน ซึ่งระบุความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวที่ 62 bp 1,350 bp และ 309 bp ตามลำดับ	112

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
48 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ที่ได้จากการแยกยีน <i>MeMRB1</i> ด้วยคูไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่ขาดหวังของทั้ง 2 ยีน อยู่ที่ประมาณ 1,400 bp	113
49 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน <i>MeMRB1</i> ก) ภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I ของยีน <i>MeMRB1</i> เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของยีนอยู่ที่ประมาณ 1,400 bp ข) แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดเอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I บนพลาสมิด pGEM [®] -T easy (เส้นสีเขียว) ที่ต่อกับยีน <i>MeMRB1</i> (เส้นสีม่วง)	114
ภาพผนวกที่	
1 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeAVP1_1	170
2 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeAVP1_1	171
3 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeAVP1_2	173
4 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeAVP1_2	174
5 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeEXO1	175
6 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO1	176

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	.	หน้า
7	ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้าง พลาสมิด pBI121:35S::MeEXO3	177
8	ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้าง พลาสมิด pBI121:pat::MeEXO3	179
9	ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้าง พลาสมิด pBI121:35S::MeMRB1	180
10	ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้าง พลาสมิด pBI121:pat::MeMRB1	181
11	แสดงผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายของ transgenic line AL-1-1 ที่มีการ สูญหายไปของโครงสร้างยีนเป้าหมาย	183

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	percent
°C	=	degree celsius
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µM	=	micromolar
ABA	=	abscisic acid
AP	=	apex
<i>AVP1</i>	=	<i>Arabidopsis</i> vacuolar H ⁺ -pyrophosphatase
BLAST	=	Basic Local Alignment Search Tool
BRs	=	brassinosteroids
bp	=	base pair
cDNA	=	complementary DNA
CK	=	cytokinin
CTAB	=	hexadecyl trimethyl ammonium bromide
DEPC	=	Diethyl pyrocarbonate
DMSO	=	dimethylsulfoxide
dNTP	=	deoxynucleoside-5'-triphosphate
DNA	=	deoxy ribonucleic acid
DTT	=	dithiothreitol
EDTA	=	disodium ethylenediamine tetraacetic acid
EtOH	=	ethanol
<i>EXO</i>	=	<i>EXORDIUM</i>
Fi	=	fibrous root
g	=	gravitational force
GAs	=	gibberellins
GA 20ox1	=	GA-20 oxidase 1
GUS	=	beta-glucuronidase
hr	=	hour

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

IPTG	=	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IM	=	infection media
kb	=	kilobase pair
<i>KNOX</i>	=	knotted-like homeobox
LB	=	Luria-Bertani
LB	=	left border
L	=	liter
M	=	molar
min	=	minute
mg	=	milligram
MGC	=	callus induction medium
MGS	=	shoot induction medium
Mk	=	molecular weight marker
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
ML	=	mature leaf
MOPS	=	3-(N-morpholino) propane sulfonic acid
NCBI	=	National Center for Biotechnology Information
NOS terminator	=	nopaline synthase terminator
ng	=	nanogram
nm	=	nanometer
OD	=	optical density
oligo (dT)	=	oligo deoxythymidine
PCR	=	polymerase chain reaction
RB	=	right border
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	round per minute

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

rRNA	=	ribosomal RNA
RT-PCR	=	reverse transcription-polymerase chain reaction
Sec	=	second
SR	=	storage root
SRC	=	cortex tissue of storage root
SRP	=	parenchyma tissue of storage root
T-DNA	=	transfer-DNA
TR	=	transition root
TS	=	top part of stem
t-ZR	=	trans zeatin riboside
v/v	=	volume per volume
Tris-HCl	=	Tris-hydrochloric acid
UDP	=	uridine di-phosphate
UTR	=	untranslated region
UV	=	ultra violet
Vir	=	virulence gene
w/v	=	weight per volume
WT	=	wild-type
X-Gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase
YL	=	young leaf
YM	=	yeast-manitol
YEP	=	yeast extract peptone

การแสดงออกของยีนสมาชิกกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* ของมันสำปะหลังในมันฝรั่ง

Expression of *AVP1 EXO* and *MRB1* Members from Cassava in Potato

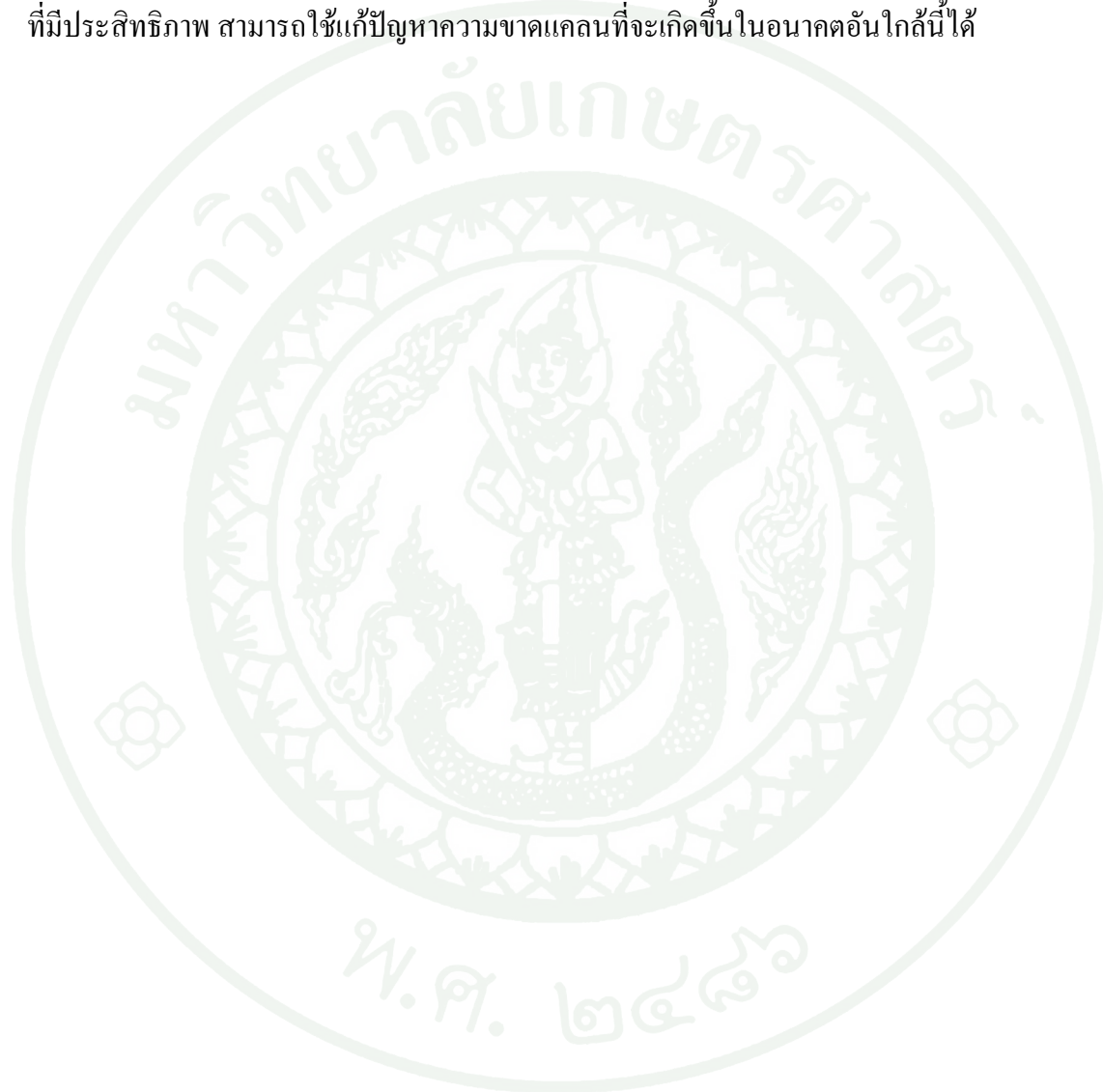
คำนำ

ในปัจจุบันปัญหาความขาดแคลนสิ่งอุปโภคบริโภคเป็นปัญหาที่สำคัญ และเป็นปัญหาหลักที่ทั่วโลกประสบอยู่ตอนนี้ ไม่ว่าจะเป็นการขาดแคลนทางด้านอาหาร ทางด้านทรัพยากรธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขาดแคลนด้านพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้กลายเป็นปัญหาที่สำคัญ (Coyle and Simmons., 2014; Zheng *et al.*, 2010) ซึ่งส่งผลกระทบต่ออย่างมากทั้งในภาคครัวเรือน และภาคอุตสาหกรรม ด้วยเหตุนี้หลายหน่วยงานไม่ว่าของภาครัฐหรือภาคเอกชนได้เล็งเห็นถึงปัญหาดังกล่าวจึงพยายามแก้ไขเยียวยาปัญหาที่เกิดขึ้น พลังงานทดแทนนับเป็นพลังงานทางเลือกที่จะนำมาใช้แทนพลังงานหลักจากเชื้อเพลิงที่กำลังจะหมดไป (Zheng *et al.*, 2010) พลังงานเหล่านี้มีการนำมาจากหลายแหล่งในธรรมชาติ หนึ่งในนั้นคือพลังงานชีวมวล พลังงานชนิดนี้เป็นพลังงานสะอาดที่ได้จากวัตถุดิบจากธรรมชาติ ที่เห็นได้ชัดในปัจจุบันคือการนำผลผลิตจากพืชที่มีคุณสมบัติเหมาะสมมาผ่านกระบวนการหมักและกลั่นให้เป็นเอทานอล ที่สามารถนำมาผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วนที่เหมาะสมทำให้ได้เชื้อเพลิงเหลวมาใช้กับเครื่องยนต์ยานพาหนะได้ พืชในกลุ่มดังกล่าวคือพืชที่มีส่วนประกอบของแป้ง และ น้ำตาลในปริมาณสูง เช่น อ้อย ข้าวโพด มันสำปะหลัง ซึ่งพืชแต่ละชนิดก็จะให้ผลผลิตเอทานอลต่อตันที่ต่างกัน รวมไปถึงต้นทุนของวัตถุดิบจากพืชเหล่านั้นก็แตกต่างกันเช่นกัน ซึ่งมันสำปะหลัง เป็นพืชเศรษฐกิจของไทยชนิดหนึ่งที่เก็บสะสมอาหารในรูปแป้งไว้ในรากในปริมาณสูงมากประมาณ 70-80 % โดยน้ำหนัก โดยรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังหรือหัวมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่สามารถให้ผลผลิตเอทานอลที่มากที่สุดและมีต้นทุนของวัตถุดิบที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับข้าวโพด และอ้อย (คณะกรรมการพลังงาน สภาแทนราษฎร, 2545) ทำให้ความต้องการของหัวมันสำปะหลังมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตมีมากขึ้น ถึงแม้ประเทศไทยมีเนื้อที่ในการปลูกมันสำปะหลังเป็นอันดับ 3 ของโลกรองจากไนจีเรียและบราซิล และมีการผลิตหัวมันสำปะหลังส่งออกสูงเป็นอันดับต้นของโลกก็ตาม (Lebot, 2009) แต่ก็ยังคงไม่เพียงพอต่อการบริโภคในเชิงอุตสาหกรรม ทำให้กระบวนการเพิ่มผลผลิตของมันสำปะหลังได้ถูกนำไปใช้กับเกษตรกร ไม่ว่าจะเป็นด้วยวิธีการให้สารอาหาร สอร์บอน หรือ ปุ๋ย เพื่อที่จะเร่งการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง หรือการเพิ่มปริมาณการเพาะปลูกมันสำปะหลังให้มากขึ้นเพื่อให้ผลผลิตเพียงพอต่อความต้องการ แต่อย่างไรก็ตามแม้เนื้อที่ในการเพาะปลูกของมันสำปะหลังใน

ประเทศไทยจะมากเป็นอันดับต้นของโลก แต่ก็ยังคงมีพื้นที่ในการเพาะปลูกที่จำกัด ด้วยเหตุนี้การเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้นกว่าปัจจุบันจึงทำได้ยากที่จะทำให้เพียงพอต่อความต้องการภายใต้พื้นที่ที่จำกัด ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ของมันสำปะหลังเพื่อให้มีขีดความสามารถในการให้ผลผลิตที่สูงขึ้น ไม่ว่าจะเป็นในเชิงเพิ่มปริมาณหัวต่อต้นหรือ เพิ่มขนาดของหัวให้มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ด้วยความหลากหลายของระบบพันธุกรรมของมันสำปะหลัง ทำให้วิธีการปรับปรุงพันธุ์ตามวิธีการดั้งเดิมอาจจะให้ผลที่ล่าช้าและไม่แน่นอน (Jennings and Iglesias., 2002) ไม่สามารถตอบสนองต่อความต้องการในปัจจุบันได้ การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้เทคนิคอณูพันธุศาสตร์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเสริมการปรับปรุงพันธุ์พัฒนาผลผลิตของหัวมันสำปะหลังให้สูงขึ้น ประกอบกับความรู้ความเข้าใจในเครือข่ายพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมลักษณะเป้าหมายที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ ที่ได้มีการศึกษาและสังสมองค์ความรู้มาจนถึงปัจจุบัน รวมกับความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านอณูพันธุศาสตร์ ทำให้ในปัจจุบันเกิดความเป็นไปได้ที่จะนำความรู้ดังกล่าวมาช่วยในกระบวนการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ของมันสำปะหลังให้สามารถดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำได้ภายในเวลาที่รวดเร็วยิ่งขึ้น

การศึกษาเครือข่ายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มยีนที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาขนาดของอวัยวะพืชในต้นพืชแม่แบบ *Arabidopsis* ทำให้สามารถเข้าใจถึงกลไกของกลุ่มยีนบางกลุ่มที่สามารถควบคุมการเจริญโตของพืชได้ เรียกกลุ่มยีนดังกล่าวว่ากลุ่มยีน Intrinsic Yield Genes (IYGs) (Gonzalez *et al.*, 2009) ด้วยองค์ความรู้ของกลุ่มยีนดังกล่าวทำให้อาจนำสมาชิกของกลุ่มยีนนี้มาปรับใช้ในกระบวนการเพิ่มผลผลิตของมันสำปะหลังได้ ซึ่งกระบวนการในการศึกษาวิจัยได้สนใจที่จะโคลนแยกและศึกษาหน้าที่ของยีนด้วยการกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วยวิธี gene overexpression โดยมุ่งศึกษาในกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญเด่นชัดในเครือข่ายพันธุกรรมที่น่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมขนาดของรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง โดยกลุ่มยีนเป้าหมายที่สนใจมีอยู่ 3 กลุ่มคือกลุ่มยีน *MRB1* *EXO* และ *AVP1* ซึ่งทั้ง 3 ยีนนี้เมื่อมีการกระตุ้นการแสดงออกแล้วนั้นสามารถที่จะส่งผลให้อวัยวะของพืชนั้นมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างชัดเจนจากการศึกษาหน้าที่ของยีนทั้ง 3 ยีนในพืชแม่แบบ *Arabidopsis* พบว่ายีน *MRB1* ส่งผลให้อวัยวะของพืชมีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ 2 เท่า รวมถึงเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติถึง 30% (Guan *et al.*, 2009) ส่วนสำหรับยีน *EXO* นั้น การเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *EXO* ด้วยกระบวนการ gene overexpression นั้นส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเจริญเติบโตในต้นพืช ทำให้มีจำนวนและพื้นที่ของใบที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งมวลของรากที่มากขึ้นกว่าต้น wild-type อย่างชัดเจน (Coll-Garcia *et al.*, 2004) และในส่วนของยีน *AVP1* พบว่าการเพิ่มระดับการแสดงออกด้วยกรรมวิธีพันธุวิศวกรรม ส่งผลให้

ต้นพืชมีการสร้างใบจำนวนมากขึ้น และใบมีขนาดพื้นที่เพิ่มขึ้นถึง 40% เมื่อเทียบกับต้น wild-type และผลของฟิโนไทป์ในราก พบว่ามีน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นได้ถึงเกือบ 10 เท่าเมื่อเทียบกับต้นปกติ (Li *et al.*, 2005) โดยองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นจากการศึกษานี้จะเป็นองค์ความรู้สำคัญที่จะทำให้สามารถเข้าใจในภาพรวมของเครือข่ายพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างและพัฒนาของรากสะสมอาหารในมันสำปะหลัง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีผลผลิตของรากสะสมอาหารที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้แก้ปัญหาคความขาดแคลนที่จะเกิดขึ้นในอนาคตอันใกล้นี้ได้



วัตถุประสงค์

1. เพื่อสืบหาและโคลนแยกยีนกลุ่ม *AVP1*, *EXO* และ *MRB1* ในกลไกพันธุกรรมควบคุมการขยายขนาดของอวัยวะของมันสำปะหลัง
2. เพื่อวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนกลุ่ม *AVP1*, *EXO* และ *MRB1* ในอวัยวะต่างๆ และระยะพัฒนาการต่างๆ ของรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง
3. เพื่อสร้าง overexpression construct สำหรับยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1*, *EXO* และ *MRB1* ของมันสำปะหลังสำหรับการถ่ายโอนยีนเพื่อการตรวจวิเคราะห์หน้าที่ของยีน
4. เพื่อตรวจสอบผลของการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1*, *EXO* และ *MRB1* ของมันสำปะหลังต่อการเจริญเติบโตของอวัยวะสะสมอาหารของพืช

การตรวจเอกสาร

1. มันทำปะหลัง

1.1. ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

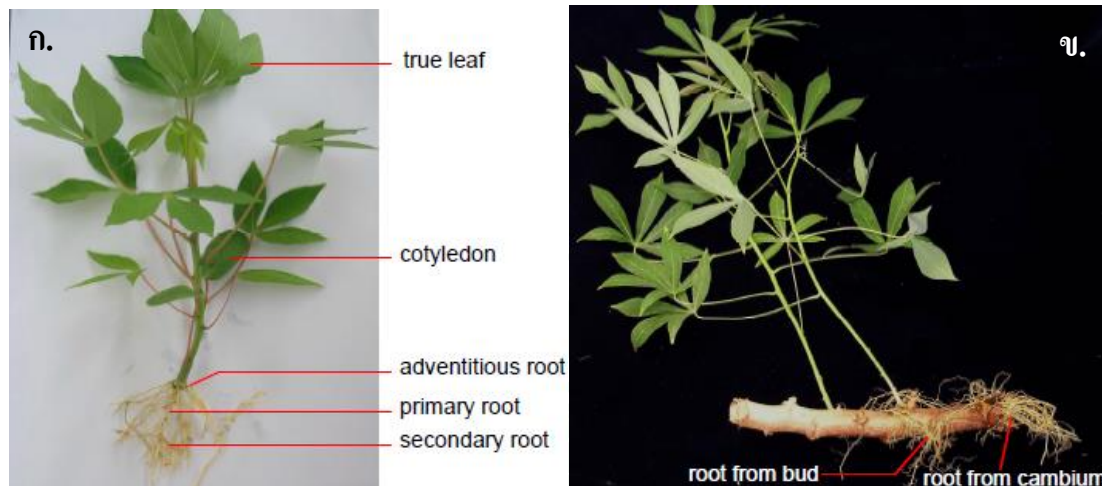
มันทำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ในสกุล *Manihot* วงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งประกอบไปด้วยสมาชิกมากกว่า 300 สกุล และ 8,000 สปีชีส์ โดยทั่วไปแล้วพืชในวงศ์นี้ส่วนใหญ่เป็นไม้พุ่มพบบ่อยในเขตร้อน พืชเศรษฐกิจสำคัญที่รู้จักกันดีและจัดอยู่ในวงศ์เดียวกันกับมันทำปะหลังคือยางพาราและละหุ่ง มันทำปะหลังเป็นหนึ่งในสมาชิกของสกุล *Manihot* ในบรรดาทั้งหมดประมาณ 98 ชนิดที่สามารถผลิตรากสะสมอาหารได้ดินขนาดใหญ่ที่อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต (Lebot, 2009) แม้ว่าจะปลูกในพื้นที่แห้งแล้งก็ตาม เนื่องจากต้นมันทำปะหลังเป็นพืชที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เลวร้ายได้ และยังคงเจริญเติบโตได้แม้จะถูกปลูกในดินที่ขาดสารอาหาร (Aleves, 2002) มันทำปะหลังเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่คนนิยมบริโภคเนื่องจาก ข้าว อ้อย และข้าวโพด โดยในการวัดค่าปริมาณแป้งในน้ำหนักแห้งของมันทำปะหลังพบปริมาณแป้งสูงถึง 80 % แต่มีปริมาณโปรตีนที่ต่ำมากต่อการบริโภค (El-Sharkawy, 2004) มันทำปะหลังในทุกสายพันธุ์จะมีการผลิตสารพิษ cyanogenic glycosides และสะสมแป้งในปริมาณมากที่ราก ในส่วนของลำต้นจะพบรอยแผลของการงอกของใบขึ้นมาอย่างเด่นชัด สีของลำต้นจะมีหลายสีทั้งสีเทา สีน้ำตาล หรือสีแดง ใบของมันทำปะหลังมีลักษณะการงอกแบบ alternate คือ 1 ข้อต่อ 1 ใบ และการเกิดของใบจะหมุนเวียนรอบลำต้น (spiral) มีก้านใบความยาว 5-30 เซนติเมตร ส่วนของด้าใบจะเว้าเป็นหยักลึกเป็นแบบ palmately lobe จำนวนหยักมีตั้งแต่ 5-7 หยักหรือบางครั้งจะพบ 3-9 หยัก ใบที่อยู่ใกล้ช่อดอกและยอดมักจะมียางขนาดเล็กกว่า และมีจำนวนหยักน้อยกว่าใบด้านล่าง ใบอ่อนจะมีสีที่แตกต่างกันไปตั้งแต่สีเหลือง เขียว หรือ สีม่วง (Lebot, 2009)

ในกรณีที่มันทำปะหลังเจริญมาจากเมล็ด มันทำปะหลังจะมีการงอกของรากแรกเกิด (radicle) แล้วพัฒนาเป็นรากแก้ว (primary root) และรากแขนง (secondary root) จากนั้นจะเปลี่ยนมาเป็นรากฝอย และพัฒนาเป็นรากสะสมอาหารในภายหลัง ส่วนมันทำปะหลังที่เจริญมาจากท่อนพันธุ์จะมีการเจริญของรากพิเศษ (adventitious root) ออกมาจากตาบริเวณส่วนฐานของท่อนพันธุ์ (ภาพที่ 1ก และ ภาพที่ 1ข) แล้วจึงพัฒนาเป็นระบบรากฝอยต่อไป (Lebot, 2009) โดยรากฝอยจำนวนหนึ่ง (3-10 ราก) จะเริ่มขยายขนาดและพัฒนาเป็นรากสะสมอาหาร ทันทีที่รากฝอยได้เกิดการพัฒนาเป็นรากสะสมอาหารความสามารถในการดูดซึมอาหารและน้ำจะลดลง ส่วนรากที่เหลือจะยังคงมี

ขนาดเล็ก และทำหน้าที่ในการดูดซึมน้ำและอาหารต่อไป (Aleves, 2002) เมื่อรากสะสมอาหารโตเต็มที่จะมีเนื้อเยื่อที่แยกออกจากกันเป็น 3 ส่วนคือ periderm, cortex และ parenchyma (ภาพที่ 2ก และภาพที่ 2ข) เนื้อเยื่อส่วน periderm หรือ bark จะอยู่ชั้นนอกสุดของรากสะสมอาหาร เกิดจากการรวมกันของเซลล์ cork ที่ตายแล้วหุ้มอยู่ที่ผิวของราก พบประมาณ 0.5-2.0 % ของน้ำหนักราก ถัดมาคือส่วนของชั้น cortex มีความหนาเพียง 1-2 มิลลิเมตร พบประมาณ 8-15 % ของน้ำหนักราก ส่วนที่อยู่ตรงกลางของรากสะสมอาหารคือชั้น parenchyma ซึ่งจะมีส่วนของ cambium ขึ้นกลางระหว่างชั้น cortex กับ parenchyma ชั้นนี้จะประกอบด้วยเซลล์ parenchyma จำนวนมากที่ใช้สะสมแป้งที่ได้จากการสังเคราะห์แสง ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการบริโภค ตรงกลางของชั้นนี้จะเป็นส่วนของ primary xylem จะพบเป็นจุดสีน้ำตาลของเนื้อมันสำปะหลัง บนผิวของรากมันสำปะหลังไม่พบส่วนของตาทำให้ไม่สามารถใช้รากของมันสำปะหลังในการขยายพันธุ์ได้ ส่วนขนาดและรูปร่างของรากสะสมอาหารจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และสภาพแวดล้อมที่ปลูก (Wheatley and Chuze, 1993; Lebot, 2009)

มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มที่มีวงจรชีวิตยาว ในช่วงชีวิตของมันสำปะหลังจะมีการสลับระหว่างช่วงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (vegetative growth) และช่วงของการสะสมอาหารของราก ระหว่างการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังจะมีการแบ่งออกเป็นระยะได้ 5 ระยะ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สภาพแวดล้อม และวิธีการเพาะปลูก ระยะแรกคือระยะการแตกกิ่ง (sprouting) จะอยู่ในช่วง 5 -15 วันแรกหลังจากการปลูกด้วยท่อนพันธุ์ หลังจากปลูกท่อนพันธุ์ลงดินประมาณ 5 วันจะเกิดการเจริญของ adventitious roots ชุดแรกออกมาจากรอยตัดของท่อนพันธุ์ หรือตาที่อยู่ใต้ดิน หลังจากนั้นในช่วงวันที่ 10 หลังจากการปลูก จะเริ่มพบการแตกกิ่ง ซึ่งการแตกกิ่งของมันสำปะหลังจะขึ้นอยู่กับลักษณะการปักของท่อนพันธุ์ เมื่อผ่านช่วง 20 วันหลังการปลูก จะเข้าสู่ระยะพัฒนาของใบและระบบราก โดยใบจะเกิดการขยายขนาดออกไปในช่วง 30 วันหลังการปลูก ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงมากขึ้นกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง ส่วนรากฝอยจะเจริญมาแทนที่รากพิเศษและมีการเจริญเติบโตประมาณ 25 เซนติเมตรต่อเดือน ลงไปในดินที่ความลึกประมาณ 40-50 เซนติเมตร หลังจากนั้นรากฝอยจำนวนหนึ่งจะพัฒนาเป็นรากสะสมอาหารในภายหลัง เมื่อการเจริญเติบโตเข้ามาสู่ช่วง 90 -180 วันหลังการปลูก จะเริ่มเข้าสู่ระยะสร้างพุ่มของต้นมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นระยะที่มีการพัฒนาของลำต้นและการแผ่ขยายของใบ ลำต้นจะมีการยืดตัว 4 เซนติเมตรต่อวัน และต้นจะมีการสร้างใบ 20-40 ใบต่อเดือน เมื่อใบแผ่ขยายเต็มที่ จะเกิดการขนส่งคาร์โบไฮเดรตจากใบไปสะสมที่รากเป็นจำนวนมาก ในช่วงอายุประมาณ 180-300 วันหลังจากการปลูก เรียกระยะการขนย้ายคาร์โบไฮเดรตหรือระยะการสะสมแป้ง เมื่อผ่านช่วง 300 วันหลังการปลูก จะเข้าสู่ระยะพัก การสร้างใบจะลดลง การสะสมแป้งที่รากสะสมอาหารยังคงดำเนินต่อไปจนกระทั่ง

ในที่สุด มันสำปะหลังจะใช้เวลาประมาณ 1 ปีในการเจริญครบ 1 รอบ และจะเริ่มเจริญเติบโตอีกครั้ง ในระยะการสะสมแป้งที่ราก (Lebot, 2009)



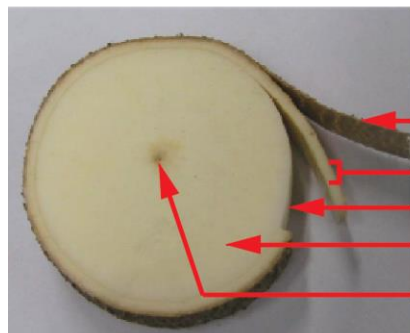
ภาพที่ 1 แสดงระบบรากของมันสำปะหลังที่งอกจากเมล็ด และรากที่พัฒนาจากท่อนพันธุ์

ก) ภาพแสดงการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังที่พัฒนามาจากเมล็ดซึ่งจะมีการพัฒนาของระบบรากแก้ว และรากแขนง (primary root และ secondary root) จากนั้นจึงมีการพัฒนาของรากพิเศษ (adventitious root) เป็นระบบรากฝอยเพื่อพัฒนาเป็นรากสะสมอาหารต่อไป ส่วนของใบจะมีโครงสร้างของใบแรกเกิด (cotyledon) ที่งอกออกมาจากเมล็ด และมีการพัฒนาของใบแท้ภายหลัง (true leaf)

ข) แสดงการเติบโตและพัฒนาของรากที่เกิดจากท่อนพันธุ์ซึ่งมีการพัฒนารากพิเศษจากตา (bud) บริเวณด้านล่างของท่อนพันธุ์ หรือพัฒนาจาก cambium บริเวณฐานของท่อนพันธุ์ ส่วนการสร้างใบจะสร้างใบแท้มาจากการแตกยอดจากตาของท่อนพันธุ์

ที่มา: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2557)

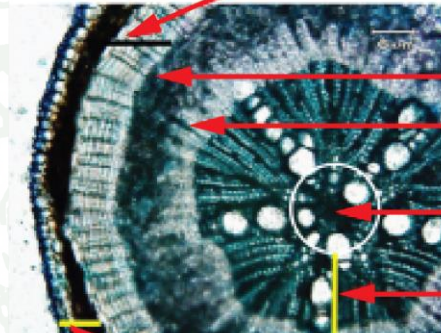
ก.



Periderm
Cortex
Cambium
Storage parenchyma
Primary xylem

Parenchyma

ข.



Cortex
Secondary phloem parenchyma
Cambium
Primary xylem
Secondary xylem parenchyma

Cortex

Parenchyma

Periderm

ภาพที่ 2 แสดงเนื้อเยื่อชั้นต่างๆของรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง

ก) ภาพตัดขวางจากรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง แสดงให้เห็นเนื้อเยื่อที่แยกออกจากกันเป็น 3 ชั้น เนื้อเยื่อชั้นนอกสุดคือ periderm ถัดมาคือ ชั้นของ cortex และชั้นในสุดคือชั้นของ parenchyma ซึ่งในชั้นนี้จะประกอบด้วยเนื้อเยื่อ cambium storage parenchyma และ primary xylem

ข) แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์ตัดขวางจากรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง แสดงให้เห็นถึงกลุ่มเซลล์ในเนื้อเยื่อต่างๆของรากสะสมอาหาร ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 3 ชั้นเช่นกัน โดยในแต่ละชั้นจะประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่แตกต่างกัน ในชั้น cortex จะประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ของ secondary phloem และ parenchyma cell ส่วนในชั้น parenchyma จะประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ของ cambium secondary xylem parenchyma cell และ primary xylem

ที่มา: ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2557); Wechkrajang (2005)

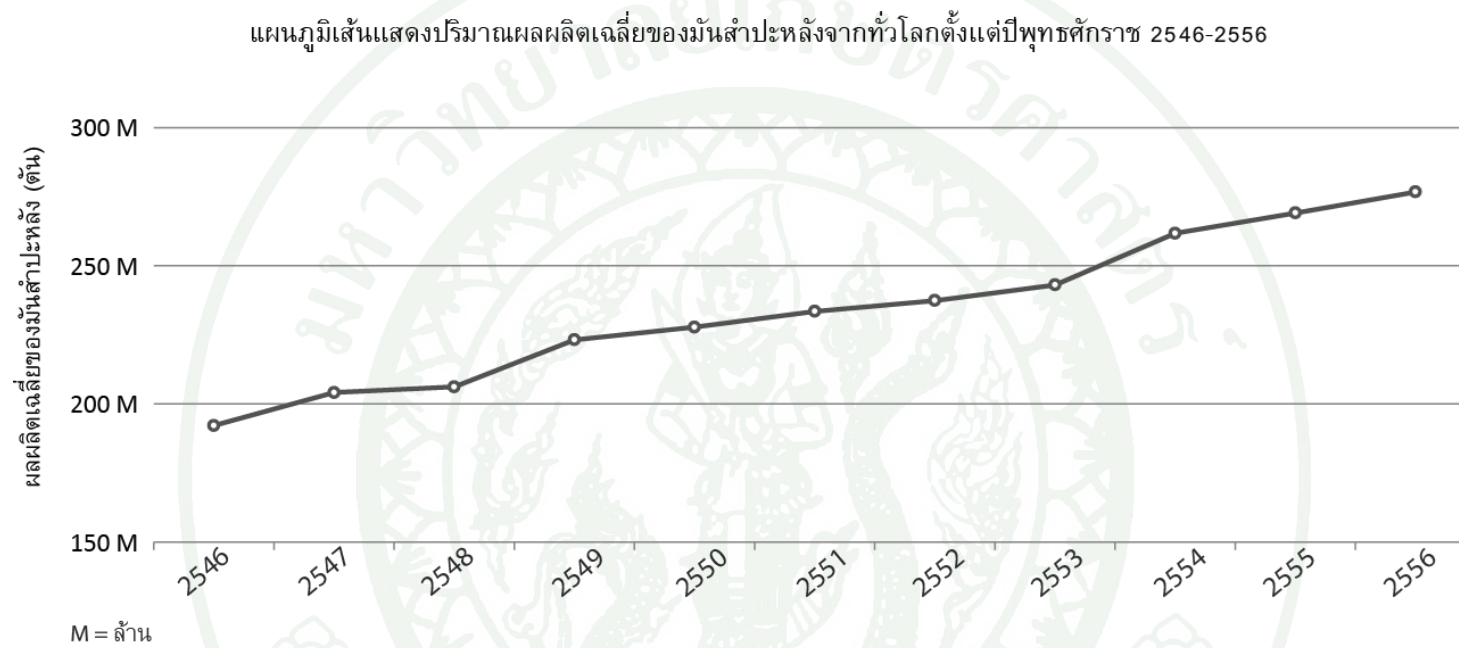
ในทุกส่วนของมันสำปะหลังยกเว้นในส่วนของเมล็ดจะมีการสะสมสารกลุ่ม cyanogenic glucoside (CG) ซึ่งในพันธุ์มันสำปะหลังที่มีการสะสมสารนี้น้อยกว่า 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กิโลกรัม จะเรียกพันธุ์ดังกล่าวว่าเป็นมันสำปะหลังหวาน (sweet cassava) ส่วนในพันธุ์ที่มีสารกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 100-500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กิโลกรัมจะเรียกสายพันธุ์นี้ว่าเป็นมันสำปะหลังขม (bitter cassava) สารในกลุ่ม CG ที่พบมากในมันสำปะหลังคือสาร linamarin ซึ่งเป็นสารที่ถูกสังเคราะห์จากใบและส่งไปสะสมที่รากมันสำปะหลัง เมื่อใดที่สาร linamarin ผ่านกระบวนการ hydrolysis จะมีการปลดปล่อยสาร cyanide (HCN) ซึ่งเป็นสารพิษต่อมนุษย์ออกมา แต่อย่างไรก็ตามการบริโภคมันสำปะหลังสดจะได้รับสารพิษดังกล่าวในปริมาณที่ร่างกายมนุษย์สามารถที่กำจัดออกไปได้ หรือการผ่านกรรมวิธีการต่างๆก่อนบริโภคก็สามารถทำให้สาร cyanide เสื่อมสภาพหรือปริมาณลดลงจนไม่ก่อให้เกิดอันตรายได้ อย่างเช่น การให้ความร้อน หรือการตากแห้งเป็นต้น (Aleves, 2002)

การศึกษาโครโมโซมของมันสำปะหลังพบว่ามีความโครโมโซมเป็น $2n=36$ และถึงแม้พฤติกรรมการเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสคล้ายกับพืชที่มีโครโมโซมแบบ diploid ก็ตาม (Allem, 1994) แต่มีการศึกษาแล้วว่าโครโมโซมของมันสำปะหลังมีลักษณะเป็น allopolyploid ที่มีโครโมโซมเริ่มต้นในแต่ละชุดอยู่ 9 แท่ง ($X = 9$) แสดงว่ามันสำปะหลังเกิดจากการผสมข้ามระหว่างพืช 2 ชนิดที่มีความใกล้เคียงกัน (Lebot, 2009) ส่งผลให้ดอกตัวผู้ของมันสำปะหลังมีลักษณะเป็นหมันเนื่องจากเกิดความผิดปกติของการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ในระยะไมโอซิส

1.2. ความสำคัญและการใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลัง

ปัจจุบันมันสำปะหลังนับเป็นพืชอาหารสำคัญที่อยู่ในอันดับ 6 ของโลกรองจากข้าว ข้าวสาลี และข้าวโพด เนื่องด้วยมันสำปะหลังมีความสามารถในการสังเคราะห์แสงสูง และสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เลวร้ายได้ดี มันสำปะหลังจึงสามารถให้ผลผลิตได้แม้จะถูกปลูกอยู่ภายใต้สถานะที่ไม่เหมาะสม ด้วยเหตุนี้มันสำปะหลังจึงถูกเลือกให้ทำหน้าที่เป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญในประเทศที่มีพื้นที่แห้งแล้งและขาดสารอาหาร ยิ่งไปกว่านั้นมันสำปะหลังยังสามารถให้ผลผลิตที่สูงแม้พื้นที่ปลูกจะมีจำกัด เมื่อเปรียบเทียบกับพืชอาหารชนิดอื่นที่ให้ผลผลิตเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตเช่นเดียวกันกับมันสำปะหลัง (El-Sharkawy, 2004) ในการศึกษาปริมาณผลผลิตของมันสำปะหลังจากทั่วโลกช่วงปี 2546-2556 พบว่าผลผลิตของมันสำปะหลังมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี (ภาพที่ 3) เนื่องจากมีปริมาณความต้องการผลผลิตมันสำปะหลังไปใช้ในการบริโภค และ

อุตสาหกรรมมากขึ้น การเปรียบเทียบอัตราส่วนผลผลิตมันสำปะหลังในแต่ละทวีปพบว่าทวีปแอฟริกา มีผลผลิตของมันสำปะหลังสูงที่สุด รองมาคือเอเชีย และอเมริกา และเมื่อพิจารณาผลผลิตในแต่ละประเทศในปี 2556 พบว่าประเทศที่มีผลผลิตสูงสุดคือที่ประเทศไนจีเรียในทวีปแอฟริกา รองลงมาคือประเทศไทย อินโดนีเซีย บราซิล และสาธารณรัฐประชาธิปไตยคองโก (ภาพที่ 4ก และภาพที่ 4ข) เนื่องจากกลุ่มประเทศเหล่านี้อยู่ในบริเวณเส้นละติจูด 30 องศาเหนือ กับ 30 องศาใต้ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังทำให้สามารถให้ผลผลิตของมันสำปะหลังได้เป็นอย่างดี (El-Sharkawy, 2004) จากข้อมูลข้างต้นประเทศไนจีเรียจึงเป็นประเทศที่มีผลผลิตมันสำปะหลังที่สูงที่สุดในโลกซึ่งผลผลิตมันสำปะหลังส่วนใหญ่จะถูกนำมาใช้บริโภคภายในประเทศ มันสำปะหลังเป็นหนึ่งในพืชอาหารหลักที่ประชากรชาวไนจีเรียนิยมบริโภค โดยเฉพาะในกลุ่มประชากรทางตอนใต้และตอนกลางของประเทศจะนิยมปลูกและบริโภคมันสำปะหลังมากกว่าประชากรที่อยู่ทางตอนเหนือของประเทศ ซึ่งจะนิยมบริโภคในกลุ่มของธัญพืชมากกว่า จากการคำนวณทางโภชนาการเกี่ยวกับพลังงานที่ประชากรไนจีเรียได้รับบริโภคจากมันสำปะหลังต่อคนอยู่ที่ 238 กิโลแคลอรี การบริโภคมันสำปะหลังในไนจีเรียมีทั้งบริโภคในรูปแบบหัวสด หรือผ่านการแปรรูปแล้ว จากข้อได้เปรียบทางสายพันธุ์ของมันสำปะหลังที่ให้ผลผลิตสูงและมีความทนต่อสภาวะแห้งแล้ง ทำให้ชาวไนจีเรียหันมาปลูกมันสำปะหลังเพื่อบริโภคมากขึ้นจนทดแทนมันเทศที่มีข้อด้อยในส่วนนี้มากกว่า และนอกจากการปลูกเพื่อบริโภคในครัวเรือนแล้ว มันสำปะหลังยังสร้างรายได้หลักให้กับประชากร ด้วยการนำผลผลิตที่ได้จากมันสำปะหลังทั้งในรูปหัวสด หรือผ่านการแปรรูปไปขายสู่ตลาดผู้บริโภค ในทางอุตสาหกรรมก็มีการนำผลผลิตจากมันสำปะหลังไปใช้เช่นกัน เช่น อุตสาหกรรมแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง แต่เนื่องด้วยความต้องการในการบริโภคโดยตรงของประชากรมีปริมาณสูงมากกว่า ทำให้มันสำปะหลังที่นำไปใช้ในภาคอุตสาหกรรมมีปริมาณที่จำกัด (Adeniji *et al.*, 2005)

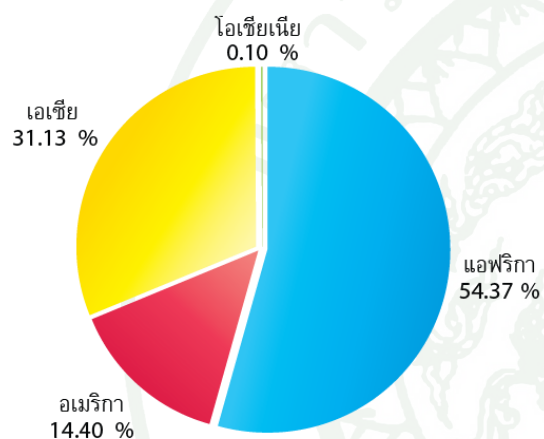


ภาพที่ 3 แผนภูมิเส้นแสดงปริมาณผลผลิตเฉลี่ยของน้ำมันสำปะหลังจากทั่วโลกตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2546-2556

ที่มา: Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] (2014)

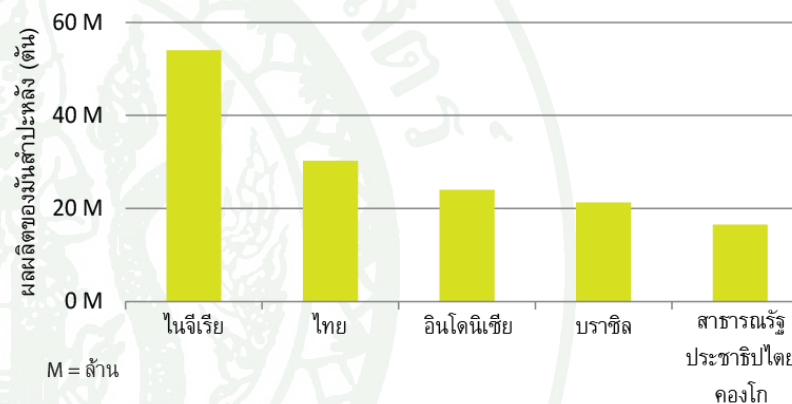
ก)

แผนภูมิวงกลมแสดงอัตราส่วนผลผลิตของน้ำมันสำปะหลังในแต่ละทวีป
ในปีพุทธศักราช 2556



ข)

แผนภูมิแท่งแสดง 5 อันดับประเทศที่มีผลผลิตของน้ำมันสำปะหลังสูงสุด
ในปีพุทธศักราช 2556



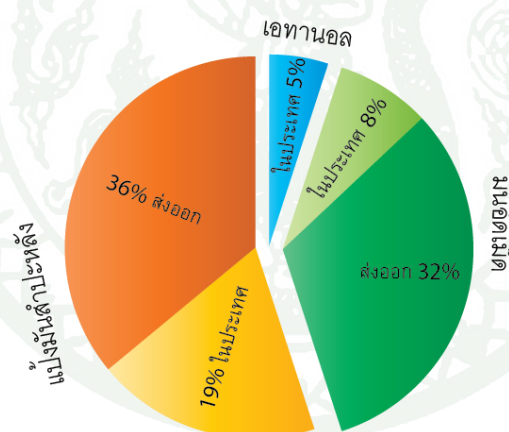
ภาพที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบผลผลิตของน้ำมันสำปะหลังแต่ละทวีป และผลผลิตใน 5 อันดับประเทศที่มีผลผลิตสูงสุด

- ก) แผนภูมิวงกลมแสดงอัตราส่วนผลผลิตของน้ำมันสำปะหลังในแต่ละทวีปในปีพุทธศักราช 2556 ประกอบด้วย แอฟริกา (สีน้ำเงิน) เอเชีย (สีเหลือง) อเมริกา (สีแดง) และโอเชียเนีย (สีขาว)
- ข) แผนภูมิแท่งแสดงอันดับประเทศที่มีผลผลิตของน้ำมันสำปะหลังสูงสุดในปีพุทธศักราช 2556 ประกอบด้วยประเทศในจีนเรีย ไทย อินโดนีเซีย บราซิล และสาธารณรัฐประชาธิปไตยคองโก

ที่มา: FAO (2014)

สำหรับในประเทศไทยมันสำปะหลังเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่มีการส่งออกมากที่สุดในโลก ถึงแม้ผลผลิตมันสำปะหลังในไทยจะเป็นรองจากประเทศไนจีเรีย และบราซิล (FAO, 2014) แต่ในกลุ่มประเทศเหล่านั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในการบริโภคภายในประเทศเป็นหลัก ในขณะที่ประเทศไทยผลผลิตของมันสำปะหลังจะเข้าสู่กระบวนการแปรรูปทั้งหมด โดยแปรรูปเป็น มันเส้นมันอัดเม็ด แป้งมันสำปะหลัง และเอทานอล เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่อเนื่อง เช่น อาหารสัตว์ อุตสาหกรรมอาหาร สารความหวาน พงชูรส กระดาษ สิ่งทอ เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) โดยความต้องการใช้ภายในประเทศในแต่ละปีประมาณ 32 % ที่เหลือ 68% จะถูกส่งออกไปสู่ต่างประเทศ จากภาพที่ 5 แสดงให้เห็นว่าผลผลิตที่ได้มาจากไร่มันสำปะหลัง 5 % จะถูกนำไปผลิตเป็นเอทานอลที่ใช้ภายในประเทศ ที่เหลือจะถูกนำไปแปรรูปเป็นมันสำปะหลังอัดเม็ดเพื่อใช้ภายในประเทศ 8 % และส่งออก 32 % และอีกส่วนหนึ่งจะถูกนำไปผลิตเป็นแป้งมันสำปะหลังดิบเพื่อใช้ในประเทศ 15 % และส่งออกนอกประเทศ 36 % (Poramacom *et al.*, 2013)

แผนภูมิวงกลมแสดงอัตราส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการแปรรูปมันสำปะหลังในประเทศไทย



ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงอัตราส่วนการส่งออกและการใช้ในประเทศของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปมันสำปะหลังในประเทศไทย ซึ่งประกอบไปด้วยเอทานอล (สีน้ำเงิน) แป้งมันสำปะหลัง (สีส้มและสีเหลือง) และมันอัดเม็ด (สีเขียวแก่และสีเขียวอ่อน)

ที่มา: Poramacom *et al.* (2013)

ผลผลิตของมันสำปะหลังได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเชื้อเพลิงทดแทนมากขึ้น เนื่องจากปัญหาพลังงานที่ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยเริ่มเผชิญตั้งแต่ปี 2547 ซึ่งเป็นสถานะที่น้ำมันเชื้อเพลิงขาดแคลนส่งผลให้ราคาน้ำมันดิบเพิ่มสูงมากขึ้น ด้วยเหตุนี้ทางภาครัฐจึงมีการผลักดันนโยบายเกี่ยวกับการพัฒนาพลังงานทางเลือกให้ผลิตออกสู่ผู้ใช้พลังงานภายในประเทศ เพื่อเป็นการลดการนำเข้าน้ำมันดิบที่มีราคาสูงจากต่างประเทศ ไบโอดีเซล (bioethanol) เป็นหนึ่งในวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตแก๊สโซฮอล์ ซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกที่มีบทบาทมากในปัจจุบัน ซึ่งไบโอดีเซลเป็นวัตถุดิบที่ผลิตได้จากแหล่งทรัพยากรชีวมวล และด้วยความอุดมสมบูรณ์ทางทรัพยากรชีวมวลของประเทศไทย ทำให้ประเทศไทยสามารถผลิตเอทานอลสู่อุตสาหกรรมผลิตเชื้อเพลิงทดแทนได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตไบโอดีเซลจากมันสำปะหลัง และ กากน้ำตาล (Papong, 2010) จากรายงานของ กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงานปี 2555 พบว่ามันสำปะหลังสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลได้เป็นอันดับสองรองจากกากน้ำตาล โดยสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ถึง 74.7 ล้านลิตรต่อปี ถึงแม้การให้ผลผลิตในการผลิตเอทานอลของ มันสำปะหลังจะไม่ดีเท่ากับกากน้ำตาลแต่เมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่นเช่น ข้าว ข้าวโพด หรือ อ้อย มันสำปะหลังก็ยังทำให้ผลผลิตเอทานอลได้ดีกว่า ทำให้มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ถูกจัดกลุ่มอยู่ในกลุ่มพืชพลังงาน ด้วยเหตุนี้เกษตรกรที่ปลูกมันสำปะหลังจึงมีช่องทางในการนำผลผลิตมันสำปะหลังจากไร่ออกไปสู่ตลาดอุตสาหกรรมเอทานอลเพิ่มอีกช่องทางหนึ่ง มากกว่าที่จะนำส่งผลผลิตที่ได้สู่โรงงานแปรรูปมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียว เมื่อมีช่องทางในการทำรายได้ผ่านการขายผลผลิตของมันสำปะหลังมากขึ้นจึงส่งผลให้เกษตรกรหันมาปลูกมันสำปะหลังมากขึ้นทุกปีซึ่งในช่วงปี 2551- 2555 ทำให้พื้นที่ในการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังมากขึ้นมีอัตราเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.61 ต่อปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556)

ในส่วนของการบริโภคมันสำปะหลังเป็นอาหารในประเทศไทย ไม่ค่อยเป็นที่นิยมนัก เนื่องจากประเทศไทยนิยมบริโภคข้าวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตมากกว่ามันสำปะหลัง อย่างไรก็ตามมันสำปะหลังยังมีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าพืชอาหารหลักของไทยอย่างข้าวในแง่ของการเป็นพืชเศรษฐกิจหลักอันดับที่สามรองจากข้าว และอ้อย ที่เสริมความแข็งแกร่งให้กับภาคเกษตรกรรมและภาคอุตสาหกรรมเช่น อุตสาหกรรมแปรรูปแป้ง และหลากหลายอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากแป้งมันสำปะหลัง ทำให้รายได้ที่ได้จากการส่งออกผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลังไปยังตลาดโลกนั้นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันส่งผลให้มีการขยายพื้นที่เพาะปลูกบวกกับการผลิตสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่ให้ผลผลิตสูงอย่างต่อเนื่อง ด้วยกรรมวิธีผสมพันธุ์แบบมาตรฐานทำให้ในปัจจุบันมันสำปะหลังของไทยมีสายพันธุ์ที่หลากหลายและมีคุณสมบัติโดดเด่นเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 1 อย่างไรก็ตามแม้ในปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังมีมาก

ถึง 1.6 ล้านไร่ แต่ก็ผลิตมันสำปะหลังได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งตามนโยบายของรัฐ ไม่ต้องการให้มีการขยายพื้นที่เพาะปลูกเนื่องจากต้องมีการจัดสรรพื้นที่สำหรับพืชเศรษฐกิจอื่นๆ และพืชอาหารจึงทำให้รัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมให้เพิ่มผลผลิตมันสำปะหลังโดยการปรับปรุงคัดเลือกสายพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูงในพื้นที่จำกัด (Sriroth *et al.*, 2007)

ตารางที่ 1 สายพันธุ์มันสำปะหลังไทยที่พัฒนาโดยกรรมวิธีผสมพันธุ์แบบมาตรฐานและลักษณะที่โดดเด่น

สายพันธุ์	ปีที่เริ่มส่งให้ เกษตรกรปลูก	พ่อแม่พันธุ์	คุณสมบัติเด่น
ระยอง 1	1975	คัดเลือกจากพันธุ์พื้นเมือง	ให้ผลผลิตสูง มีการปรับตัวได้ดี
ระยอง 3	1983	MMex 55 x MVen 307	ปริมาณน้ำหนักแห้งของรากสูง ปริมาณไซยาไนด์ในรากต่ำ
ระยอง 60	1987	MCol 1684 x ระยอง 1	เก็บเกี่ยวผลผลิตได้เร็ว ให้ผลผลิตสูง
ระยอง 90	1991	CMC 76 x V43	ปริมาณน้ำหนักแห้งของรากสูงให้ผลผลิตสูง
เกษตรศาสตร์ 50	1992	ระยอง 1 x ระยอง 90	ปริมาณน้ำหนักแห้งของรากสูง ให้ผลผลิตสูง และ มีการปรับตัวได้ดี
ระยอง 5	1994	CMR 27-77-10 x ระยอง 3	ปริมาณน้ำหนักแห้งของรากสูง ให้ผลผลิตสูง และ มีการปรับตัวได้ดี
ระยอง 72	1999	ระยอง 1 x ระยอง 5	ปริมาณน้ำหนักแห้งของรากสูง ให้ผลผลิตสูง และ มีการปรับตัวได้ดีในเขต พื้นที่ภาคเหนือของไทย
ห้วยบง 60	2003	ระยอง 5 x เกษตรศาสตร์ 50	ปริมาณน้ำหนักแห้งของรากสูง ให้ผลผลิตสูง และแบ่งจากรากมีความหนืดสูง
ระยอง 7	2005	CMR30-71-25 x OMR29-20-118	ให้ผลผลิตสูง มีการปรับตัวได้ดี
ระยอง 9	2005	CMR31-19-23 x OMR29-20-118	ให้ผลผลิตสูง และเหมาะสำหรับเป็นวัตถุดิบใน การผลิตเอทานอล

ที่มา: Sriroth *et al.* (2007)

1.3. การปรับปรุงสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง

การปรับปรุงสายพันธุ์ของมันสำปะหลังเป็นปัจจัยหลักที่จะช่วยให้เกษตรกรได้รับผลประโยชน์สูงสุดจากการเพาะปลูกมันสำปะหลังด้วยมันสำปะหลังพันธุ์ดี เป้าหมายของนักปรับปรุงพันธุ์พืชมีหลากหลายด้านขึ้นอยู่กับสถานะแวดล้อมที่แตกต่างกัน และการประสบปัญหาของเกษตรกรในแต่ละพื้นที่ที่แตกต่างกัน รวมถึงสายพันธุ์ดั้งเดิมของแต่ละพื้นที่ที่มีคุณลักษณะแตกต่างกันด้วย (Sleper and Poehlman, 2006) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังจึงมีการปรับปรุงพันธุ์ในหลากหลายปัจจัยขึ้นอยู่กับแต่ละพื้นที่ที่เพาะปลูก ไม่ว่าจะเป็นการลดปริมาณกลุ่มสาร cyanogenic glucosides ที่เป็นสารพิษที่พบได้ในรากสะสมอาหารมันสำปะหลัง การเพิ่มปริมาณโปรตีนหรือสารอาหารอื่นจำพวกวิตามินลงไปในผลผลิตของมันสำปะหลัง เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้แก่ผู้บริโภค และการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานต่อโรค แมลงศัตรูพืช และสถานะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ที่จะทำให้ผลผลิตของมันสำปะหลังลดต่ำลง (Jennings and Iglesias, 2002) Ceballos *et al.* (2012) ได้ชี้ให้เห็นว่าการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีผลผลิตของรากสะสมอาหารในปริมาณที่สูงและมีคุณภาพมากขึ้น เป็นเป้าหมายหลักของนักปรับปรุงพันธุ์ในทุกภูมิภาค เพื่อที่จะสามารถตอบสนองต่อความต้องการของผลผลิตจากมันสำปะหลังที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากปัจจุบันมันสำปะหลังได้เข้ามามีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมแปรรูป การผลิตเอทานอล และเป็นแหล่งอาหารสำคัญในบางพื้นที่

การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังแบบดั้งเดิมเป็นการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะเด่นตรงตามคุณลักษณะที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ มาผสมข้ามพันธุ์แล้วทำการคัดเลือกพันธุ์ในรุ่นต่อมาหลายรุ่นเพื่อให้ได้พันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะตรงตามที่ต้องการ (Jennings and Iglesias, 2002; Ceballos *et al.*, 2012) แต่เนื่องด้วยลักษณะทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังมีระดับความเป็น heterozygosity ที่สูง (Lebot, 2009) จึงทำให้วิธีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการดั้งเดิมเกิดข้อจำกัด ซึ่งข้อด้อยหลักของวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมคือต้องคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในรุ่นลูกที่มีจำนวนมาก และจากการที่มีระดับ heterozygosity สูงจำเป็นต้องมีการผสมคัดเลือกพันธุ์กันหลายรุ่น ซึ่งในแต่ละรุ่นก็จะมีจำนวนประชากรที่ต้องคัดเลือกเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆจนกว่าจะได้รุ่นลูกที่มีคุณสมบัติตามต้องการ ทำให้ต้องใช้เวลาและแรงงานเป็นจำนวนมาก อีกทั้งการคาดเดาลักษณะที่จะเกิดขึ้นในรุ่นลูกยังทำได้ยากอีกด้วย (Ceballos *et al.*, 2012)

ด้วยข้อจำกัดของการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการดั้งเดิมทำให้อนาคตของการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังมีโอกาสประสบความสำเร็จน้อยรวมถึงต้องใช้เวลาอันนาน แต่ในปัจจุบันความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) มีมากขึ้น จึงสามารถนำความรู้ดังกล่าวเข้ามามีบทบาทในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง ยกตัวอย่างเช่น การนำเทคนิคทางเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้คัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังทำให้ลดเวลาในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการลง อีกทั้งยังมีความแม่นยำสูงกว่าวิธีการคัดเลือกแบบดั้งเดิม เทคนิคการถ่ายโอนยีน หรือเทคนิคพันธุวิศวกรรมเป็นเทคนิคที่มีบทบาทสำคัญในการส่งถ่ายลักษณะที่ต้องการจากพืชสายพันธุ์หนึ่งไปสู่อีกสายพันธุ์หนึ่งได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่มีผลกระทบต่อลักษณะอื่นๆของสายพันธุ์ และข้ามข้อจำกัดทางพันธุกรรมต่างๆของมันสำปะหลังไปได้ (Jennings and Iglesias, 2002; Lebot, 2009) และปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคอุปกรณ์ที่ทันสมัย รวมทั้งความรู้ความเข้าใจในกลไกกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ และความรู้ทางชีวโมเลกุลของมันสำปะหลังที่เริ่มมีการสั่งสมมากขึ้น ทำให้การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์มันสำปะหลังทำได้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในระยะเวลาที่สั้นลง (Fregene and Puonti-Kaerlas, 2002) ประกอบกับในปัจจุบันข้อมูลจีโนมของมันสำปะหลังได้ถูกศึกษาวิเคราะห์ หุ่นสามารถสร้างฐานข้อมูลจีโนมที่สามารถสืบค้นและเข้าถึงได้จาก www.phytozome.net/cassava ทำให้การศึกษาลักษณะต่างๆที่ผ่านกลไกการควบคุมของโครโมโซมในมันสำปะหลังมีความสะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้มาช่วยในระบบการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังได้

2. กลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างอวัยวะสะสมอาหาร

รากของมันสำปะหลังจะเริ่มจากการพัฒนาในช่วง 5-15 วันแรกนับจากวันออกปลูก โดยเริ่มจากการสร้างรากพิเศษ (adventitious roots) จากเนื้อเยื่อที่เป็น vascular cambium บริเวณส่วนฐานของท่อนพันธุ์ที่ออกปลูก จากนั้นกลุ่มของรากพิเศษนี้จะมีเพียงบางรากที่จะเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาเพื่อพัฒนาเป็นรากสะสมอาหาร โดยผ่านการกระตุ้นกระบวนการแบ่งเพิ่มจำนวนเซลล์บริเวณรอบ vascular cambium ควบคู่ไปกับการรวบรวมและสะสมเม็ดแป้งในรากที่กำลังขยายตัว ส่วนรากพิเศษที่ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาจะถูกแทนที่ด้วยรากฝอยที่เจริญมาแทนรากชุดแรกและทำหน้าที่ในการดูดน้ำและสารอาหารต่อไป (Lebot, 2009) รากสะสมอาหารของมันสำปะหลังเป็นหนึ่งในอวัยวะสะสมอาหารเช่นเดียวกับหัวของมันฝรั่งที่มีบางกระบวนการในการสะสมอาหารที่คล้ายกัน ถึงแม้ว่าต้นกำเนิดของทั้งสองอวัยวะจะเกิดมาจากส่วนที่แตกต่างกัน (Ku *et al.*, 2008) และอีกหนึ่งในพืชที่มีอวัยวะสะสมอาหารที่ใกล้เคียงกับมันสำปะหลังและมีการพัฒนาจากต้นกำเนิดเดียวกัน คือมันเทศ (Lebot, 2009) ซึ่งกลไกของการพัฒนา

อวัยวะสะสมอาหารเหล่านี้มีกระบวนการที่คล้ายคลึงกัน โดยจะขึ้นอยู่กับกระบวนการสำคัญ 2 กระบวนการ คือกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและสัณฐานวิทยาของอวัยวะที่อยู่ใต้ดินให้เกิดการขยายขนาดใหญ่ขึ้น และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีซึ่งมีผลให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล และเก็บสะสมเอาไว้ในอวัยวะสะสมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารจำพวกแป้ง (Hannapel, 2007) โดยปัจจัยสำคัญในการควบคุมกระบวนการขยายขนาดและการขนส่งแป้งมาสะสมที่รากสะสมอาหารยังคงไม่สามารถระบุได้แน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามจากข้อมูลในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่าปัจจัยต่างๆ ภายในและภายนอกมีผลในการควบคุมระดับความสมดุลของฮอร์โมนที่มีผลต่อกระบวนการแบ่งเพิ่มจำนวนเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในช่วงก่อนการพัฒนารากสะสมอาหาร

ปัจจัยภายนอกจากสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่จะมีผลควบคุมการเจริญเติบโต และการสร้างรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง ซึ่งมีผลต่อผลผลิตของมันสำปะหลัง ปัจจัยของแสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญเนื่องจากมีผลต่อกระบวนการเจริญเติบโต การศึกษาของช่วงวันต่อการสร้างรากสะสมอาหารพบว่า ช่วงวันยาวจะมีผลต่อการลดการพัฒนาของรากสะสมอาหารแต่มีการเจริญของมันสำปะหลังในส่วนที่ยอดมากกว่า แต่เมื่อมันสำปะหลังถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีช่วงวันสั้นจะมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของมันสำปะหลังแต่การเจริญของยอดจะลดลง (Aleves, 2002) นอกจากนี้แสงยังมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการพัฒนาส่วนต่างๆ ของพืช โดยพบว่าหากมันสำปะหลังถูกเลี้ยงในบริเวณที่มีแสงน้อยจะมีผลต่อผลผลิตของมันสำปะหลัง คือเมื่อมีแสงน้อยจะทำให้กระบวนการขยายขนาดของรากเกิดช้าและจำนวนของรากที่เกิดขึ้นจะลดลง (Okoli and Wilson, 1986) อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเกิดเจริญเติบโตของรากสะสมอาหาร เมื่อทดสอบเลี้ยงต้นมันสำปะหลังภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 16 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังลดลง รวมถึงการวัดน้ำหนักแห้งของรากสะสมอาหารที่ได้จากต้นมันสำปะหลังที่ถูกเลี้ยงในอุณหภูมิดังกล่าวมีน้ำหนักลดลง (Cock and Rosas, 1975) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังอยู่ที่ประมาณ 25-29 องศาเซลเซียส

นอกจากปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมแล้วอีกหนึ่งในปัจจัยหลักที่มีผลต่อการกระตุ้นให้พืชสร้างอวัยวะสะสมอาหารคือความสมดุลของฮอร์โมนในพืช โดยพืชที่มีหัวใต้ดินและในพืชที่มีรากสะสมอาหารอย่างมันสำปะหลังต่างถูกควบคุมการเกิดด้วยสมดุลฮอร์โมนเช่นเดียวกัน สมดุลฮอร์โมนที่สำคัญที่มีผลต่อการสร้างอวัยวะสะสมอาหารคือสมดุลฮอร์โมน จิบเบอเรลลิน (gibberellins) และ ไซโตไคนิน (cytokinins) (Hannapel, 2007)

โดยทั่วไปแล้วจิบเบอเรลลินจะมีผลยับยั้งกระบวนการเกิดหัวใต้ดินมันฝรั่ง โดยสัมพันธ์กับสภาวะของช่วงวัน ซึ่งพบว่าภายใต้สภาวะช่วงวันยาวจะมีการสะสมจิบเบอเรลลินที่ปลายสโตลอน (stolon) ของมันฝรั่ง ซึ่งผลจากการมีปริมาณจิบเบอเรลลินสูงที่สโตลอนทำให้เกิดการเจริญยืดยาวของลำต้นสโตลอนไปในดิน แต่เมื่อใดก็ตามที่ปริมาณจิบเบอเรลลินลดต่ำลงจะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการสร้างหัวใต้ดินขึ้น (Hannapel, 2007) ปริมาณที่ลดต่ำลงของจิบเบอเรลลินจะพบได้เมื่อนำต้นมันฝรั่งไปเลี้ยงในสภาวะที่เป็นช่วงวันสั้น และในกรณีของมันสำปะหลัง การใช้สารกลุ่มที่มีผลยับยั้งการสร้างจิบเบอเรลลินเช่น triazole ทำให้ปริมาณจิบเบอเรลลินลดลงในมันสำปะหลัง ส่งผลให้ผลผลิตของรากและปริมาณแป้งในรากสะสมอาหารเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Gomathinayagam *et al.*, 2007)

ในการศึกษาบทบาทของไซโตไคนินต่อกระบวนการสร้างอวัยวะสะสมอาหาร พบว่าในมันฝรั่งมีการสะสมของไคเนทิน (kinetin) บริเวณปลายสโตลอนก่อนที่จะมีการสร้างหัวใต้ดิน (Palmer and Smith, 1969; Smith and Palmer, 1970) เมื่อพิจารณาถึงหน้าที่ของไซโตไคนินต่อกระบวนการสร้างหัว พบว่าไซโตไคนินมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์และรวบรวมแป้งที่หัวใต้ดิน ซึ่งการศึกษาของ Palmer and Barker (1973) ได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ไคเนทินแก่สโตลอนจะทำให้กระบวนการสังเคราะห์แป้งเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ได้พบว่าสารไซโตไคนินกลุ่มทราน-ซีเอทิน ไรโบไซด์ (t-ZR) มีส่วนในการกระตุ้นกระบวนการแบ่งเซลล์ในช่วงเริ่มต้นของการสร้างรากสะสมอาหารของมันเทศ (Matsuo *et al.*, 1922) และเมื่อพิจารณาปริมาณ t-ZR ในมันเทศพันธุ์ที่มีการกลายทำให้การสร้างรากสะสมอาหารเกิดช้าพบว่าปริมาณ t-ZR ที่สะสมในรากจะเพิ่มขึ้นช้าตามไปด้วย (Nakatani *et al.*, 2002) แสดงให้เห็นว่า สารไซโตไคนินน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเริ่มสร้างรากสะสมอาหาร การศึกษาหน้าที่ของไซโตไคนินโดยให้ t-ZR ในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสสูงมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างรากสะสมอาหาร ซึ่งพบการแพร่กระจายและเพิ่มจำนวนของ t-ZR ภายในรากสะสมอาหารในช่วงที่กำลังพัฒนาและขยายขนาด (Tanaka *et al.*, 2008) ผลดังกล่าวทำให้ทราบว่าในช่วงที่รากสะสมอาหารกำลังขยายขนาด การสะสมน้ำตาลซูโครสในรากสะสมอาหารในระยะนี้ จะทำให้มีการสร้าง t-ZR ภายในเซลล์มากขึ้น จากนั้น t-ZR ที่สะสมมากขึ้นจะไปกระตุ้นกระบวนการแบ่งเซลล์ทำให้เกิดการขยายขนาดของรากสะสมอาหารเพิ่มมากขึ้น

3. อิทธิพลของยีนต่อกระบวนการสร้างอวัยวะสะสมอาหาร

3.1. ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างอวัยวะสะสมอาหาร

ในการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการสร้างและพัฒนาของรากสะสมอาหาร ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยทั้งสภาพแวดล้อม หรือปัจจัยทางด้านฮอร์โมน ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะมีผลสัมพันธ์กับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ชักนำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ในรูปแบบการแสดงออกของยีน และมีผลควบคุมกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ทำให้เกิดการขยายขนาดของรากจนเป็นรากสะสมอาหารที่สมบูรณ์ (Prat *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1992; Kolomiets *et al.*, 2001) ดังนั้นปัจจัยอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดรากสะสมอาหารคือปัจจัยจากการควบคุมของยีน ในการศึกษากลไกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังยังไม่พบกลไกที่แน่ชัด แต่มียีนบางกลุ่มยีนในมันเทศที่มีระบบสะสมอาหารในรูปแบบรากสะสมอาหารเช่นเดียวกันกับมันสำปะหลังได้ถูกพบว่ามี การแสดงออกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างรากสะสมอาหารในมันเทศ การศึกษาของ Tanaka *et al.* (2008) สามารถแยกยีน class I knotted1-like homeobox (*KNOX1*) จากมันเทศได้ ซึ่งจากการศึกษาพบว่ายีน *KNOX1* มีผลต่อระดับ t-ZR ที่สูงมากขึ้นในรากสะสมอาหารที่กำลังพัฒนาและรากสะสมอาหารที่มีอายุมากขึ้นเมื่อเทียบกับรากฝอยของมันเทศ แสดงให้เห็นว่า ยีน *KNOX1* น่าจะมีผลต่อกระบวนการสร้างและสะสมของไซโตไคนินในรากสะสมอาหาร นอกจากนี้ยีน *IbMADS1* ในมันเทศได้ถูกศึกษาหน้าที่โดย Ku *et al.* (2008) พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างรากสะสมอาหาร โดยอาศัยการศึกษาหน้าที่โดยถ่ายโอนพาหะ overexpression ของยีน *IbMADS1* พบว่าในมันเทศที่ได้รับยีนมีลักษณะรากที่โป่งพองมากขึ้น ซึ่งมันเทศเป็นผลมาจากการแบ่งเซลล์ในรากเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาของ Noh *et al.* (2010) ได้พบอีกยีนหนึ่งในมันเทศที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *IbMADS1* ถึง 99 % คือยีน *SDR1* ซึ่งเมื่อศึกษาหน้าที่ในมันเทศพบว่า ยีน *SDR1* มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเริ่มกระบวนการเจริญโป่งพองในรากสะสมอาหารของฮอร์โมนออกซิน (auxin) โดยมีผลเพิ่มกระบวนการแบ่งเซลล์ของ metaxylem และ cambium cell

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกระบวนการสร้างรากสะสมอาหารเป็นเพียงแค่ส่วนหนึ่งของกลไกทั้งหมดในการเกิดรากสะสมอาหาร ซึ่งกลไกการสร้างรากสะสมอาหารมีกระบวนการที่ซับซ้อนและขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายปัจจัยทั้งภายในและภายนอก ดังนั้นการที่จะเข้าใจโครงข่ายยีนที่เกี่ยวข้องกระบวนการสร้างรากสะสมอาหารทั้งหมดจำเป็นต้องศึกษา และสร้างองค์ความรู้เพิ่มเติมจากองค์ความรู้ของยีนข้างต้นเป็นกระบวนการหนึ่งในการกระตุ้นและส่งสัญญาณให้แก่ราก เพื่อให้

รากธรรมชาติเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นรากที่ใช้ในการสะสมอาหาร ดังนั้นเมื่อผ่านกระบวนการกระตุ้นในขั้นต้นแล้ว กระบวนการต่อไปที่จะส่งผลให้รากเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างคือการกระตุ้นกระบวนการแบ่งเซลล์ และขยายขนาดของเซลล์ให้เพิ่มมากขึ้น เพื่อที่จะรองรับปริมาณแป้งจำนวนมากที่ได้จากการสังเคราะห์แสง และส่งมาสะสมในรากสะสมอาหาร ดังนั้นกระบวนการเพิ่มขนาดของรากน่าจะเป็นกระบวนการสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อระบบการสร้างรากสะสมอาหารในมันสำปะหลัง

3.2. ยีนควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะพืช

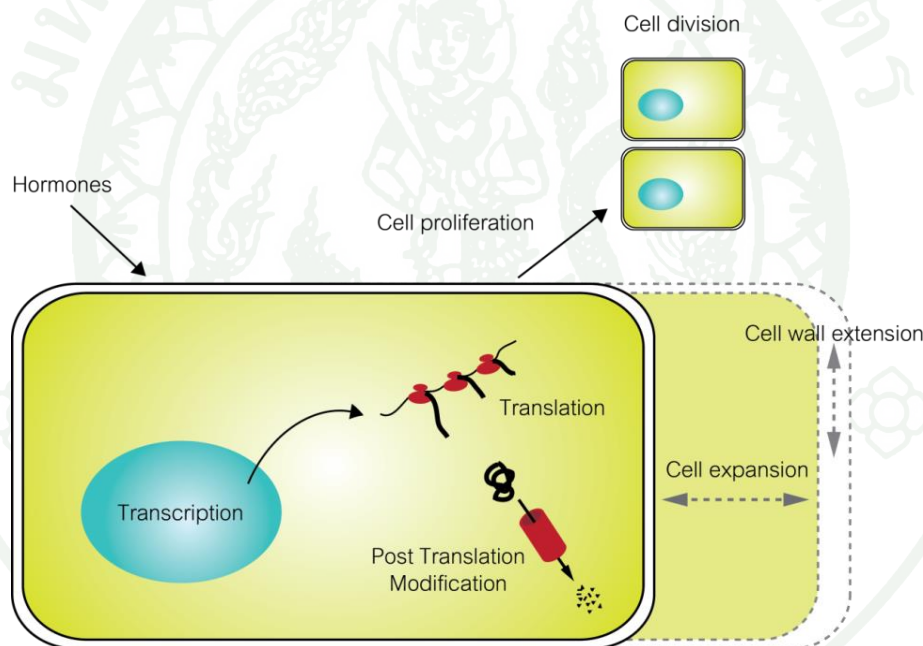
กลไกการสร้างอวัยวะสะสมอาหารประกอบด้วยกลไกสำคัญ 2 กลไก คือกลไกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาให้เกิดการขยายขนาดของรากมากขึ้น กับกลไกการสร้างและสะสมแป้งของอวัยวะสะสมอาหารควบคู่กัน (Hannapel, 2007) จากการศึกษากลไกและปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างอวัยวะสะสมอาหาร ซึ่งให้เห็นว่ากลไกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของอวัยวะสะสมอาหารเป็นกลไกที่สำคัญ ซึ่งกลไกดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเพิ่มจำนวนเซลล์และการขยายขนาดเซลล์ของพืชทำให้พืชมีขนาดที่ใหญ่มากขึ้น โดยจากการศึกษาโครงข่ายยีนในปัจจุบันพบว่ามียีนกลุ่มหนึ่งในต้น *Arabidopsis* ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มขนาดอวัยวะพืชให้มีผลผลิตมากขึ้นเรียกยีนกลุ่มดังกล่าวว่า Intrinsic Yield Genes (IYGs) แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการที่ยีนกลุ่มนี้มีผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชส่วนใหญ่ยังคงไม่ทราบแน่ชัด (Gonzalez *et al.*, 2009) ในกลุ่มยีน IYGs มีสมาชิกหลากหลายยีน ซึ่งแต่ละยีนมีการแสดงออกเป็นโปรตีนหลายกลุ่มที่มีผลต่อกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ ทำให้เกิดการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (ภาพที่ 7) บางกลุ่มยีนแสดงออกเป็นโปรตีนที่มีผลควบคุมกระบวนการถอดรหัส (transcription factor) ที่จะทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีนอื่นที่มีผลต่อกระบวนการเจริญเติบโตของพืช เช่นการศึกษา ยีน *GRF5* (*GROWTH-REGULATING-FACTOR 5*) และยีน *AN3* (*ANGUSTIFOLIA 3*) พบว่าเมื่อเพิ่มระดับการแสดงออกของทั้ง 2 ยีนมีผลทำให้มีการสร้างใบขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของ 2 โปรตีนข้างต้น ในการควบคุมกระบวนการแบ่งเซลล์ของพืช (Horiguchi *et al.*, 2005)

ในกระบวนการถอดรหัสของยีน (translation) พบการรายงานว่ายีนในกลุ่มยีน IYGs สามารถควบคุมกระบวนการดังกล่าวได้ เช่น TOR kinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นการเจริญเติบโตโดยการควบคุมกระบวนการภายในเซลล์หลายกระบวนการ หนึ่งในนั้นคือการควบคุมกระบวนการถอดรหัสของไรโบโซม จากการศึกษาในต้น *Arabidopsis* การแสดงออกของยีน TOR ที่มากขึ้นมีผลต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตของยอดและราก (Deprost *et al.*, 2007) นอกจากนี้พบว่าการสร้างใบและผลิตเมล็ดมากขึ้นในต้นพืชที่ขาดการแสดงออกของ DA1 ที่เป็นตัวรับสัญญาณของ ubiquitin ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ post-translational modification ของโปรตีน (Li *et al.*, 2008)

ฮอร์โมนพืชเป็นปัจจัยหลักที่ควบคุมการส่งสัญญาณให้มีการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้น หลายสมาชิกในกลุ่มยีน IYGs จึงมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการปรับเปลี่ยนระดับฮอร์โมนพืช ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น ในกรณีของฮอร์โมนกลุ่ม brassinosteroid พบว่ายีน *EXO* มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อมีการให้ brassinosteroids แก่พืชและเมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *EXO* ส่งผลให้เกิดการสร้างใบขนาดใหญ่และส่งผลกระตุ้นการเจริญของราก ส่วนสำหรับฮอร์โมนออกซิน Li *et al.* (2005) ได้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน AVP1 มีหน้าที่ควบคุมการขนส่งออกซินในพืชทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน ดังนั้นเมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *AVP1* จึงมีผลต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตของยอดและราก

ถึงแม้ว่าสมาชิกในกลุ่มยีน IYGs หลายยีนมีผลควบคุมการเจริญเติบโตของพืชซึ่งสุดท้ายแล้วจะมีผลต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ของพืช แต่ยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับยีนควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีผลต่อการควบคุมวัฏจักรของเซลล์โดยตรง อย่างไรก็ตามได้มีรายงานของยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับบางส่วนของกลไกควบคุมวัฏจักรของเซลล์คือยีน *ABAPI* ที่แสดงออกให้โปรตีน Armadillo-BTB *Arabidopsis* Protein 1 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ด้วยการจำกัดกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) ซึ่งผลจากการลดการแสดงออกของยีนทำให้เกิดการสร้างใบขนาดใหญ่ที่มีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น (Masuda *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการขยายขนาดเซลล์ (cell expansion) และกระบวนการขยายของผนังเซลล์ (cell wall extension) คือยีนในกลุ่มที่ผลิต expansins โดยจากการศึกษาการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *EXP10* ส่งผลให้เกิดการสร้างใบที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งมีผลมาจากการขยายขนาดของเซลล์ในใบ (Cho and Cosgrove, 2000)

การศึกษากลุ่มยีนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ผ่านกระบวนการต่างๆภายในเซลล์พืช ถึงแม้ว่ากระบวนการยังคงไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน แต่องค์ความรู้ที่ได้สามารถทำให้เข้าใจกลไกบางส่วนของกระบวนการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ภาพที่ 6 แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเจริญเติบโตของพืชสามารถถูกกระตุ้นด้วยการส่งสัญญาณจากการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนพืช และการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนหลายชนิดซึ่งเป็นผลจากกระบวนการถอดรหัส และแปลรหัสของยีน ซึ่งผลสุดท้ายของกลไกต่างๆ เหล่านี้จะส่งผลให้เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ และขยายขนาดของเซลล์ ทำให้เกิดการเจริญเติบโตของพืชในที่สุด (Gonzalez *et al.*, 2009) ดังนั้นเมื่อนำกลุ่มยีน IYGs มาสรุปความสัมพันธ์กับกลไกการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชดังภาพที่ 7 จะชี้ให้เห็นว่ายีนมีอิทธิพลมากต่อการเกิดการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้นการเจริญพัฒนาของรากสะสมอาหารในมันสำปะหลังก็น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับยีนกลุ่ม IYGs เช่นกัน

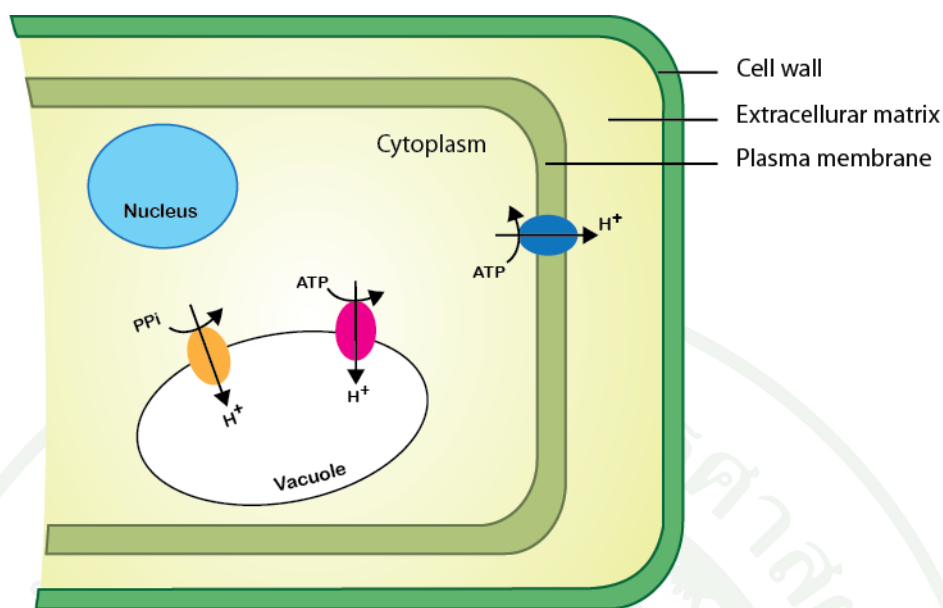


ภาพที่ 6 แสดงกลไกการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชผ่านกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์พืช ประกอบด้วย การส่งสัญญาณผ่านฮอร์โมนพืช กระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสของยีน รวมถึงกระบวนการ post-translational modification ของโปรตีน ทำให้เกิดกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลล์คือกระบวนการแบ่งเซลล์ กระบวนการขยายเซลล์ และกระบวนการขยายของผนังเซลล์ทำให้เกิดการเจริญเติบโตและขยายขนาดของอวัยวะพืช

ที่มา: Gonzalez *et al.* (2009)

3.2.1. บทบาทของยีน *AVP1*

โปรตีนขนส่ง (transport protein) ในพืชมีส่วนช่วยในการส่งสัญญาณและการเกิดกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ ในโปรตีนขนส่งหลากหลายชนิดในเซลล์พืชมีโปรตีนขนส่งกลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการขนส่งโมเลกุลโปรตอน (proton; H^+) ผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์หรือออร์แกเนลล์ (organelle) ทำให้เกิดความต่างของระดับโปรตอน (proton gradients) ระหว่างภายในและภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งในพืชโปรตีนกลุ่มนี้ถูกแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Sze and Palmgren, 1999) ดังแสดงในภาพที่ 8 กลุ่มแรกคือ P-type H^+ -adenosine triphosphatase (P-ATPase) เป็นโปรตีนที่มีเพียงหน่วยเดียว (single-subunit protein) จะพบอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช หน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้จะมีหน้าที่ผลักดัน H^+ ออกจากเซลล์ โดยอาศัยพลังงานจาก ATP (Serrano, 1993) ถัดมาเป็น vacuolar H^+ -ATPase (V-ATPase) เป็นโปรตีนเชิงซ้อน (complex protein) ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยหลายหน่วยซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่ได้จากยีนประมาณ 26 ยีน พบอยู่บนเยื่อหุ้มแวคิวโอล (vacuolar) ของพืช โปรตีนกลุ่มนี้มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาของอเมบรีโอและการขยายขนาดเซลล์ (Padmanaban *et al.*, 2004; Strompen *et al.*, 2005) สุดท้ายคือ vacuolar H^+ -pyrophosphatases (V-PPases) พบที่เยื่อหุ้มแวคิวโอลเช่นเดียวกับ V-ATPase แต่จะอาศัย pyrophosphate (PPi) เป็นพลังงานในการขับเคลื่อนโปรตอนแทน ATP และเป็นโปรตีนที่เกิดจากโปรตีนหน่วยเดียวต่างจาก V-ATPase ที่เป็นโปรตีนเชิงซ้อนหลายหน่วย (Rea *et al.*, 1992) ในจีโนมของ *Arabidopsis* พบ V-PPases อยู่ 2 ชนิดคือ H^+ -PPase type I (*AVP1*) และ H^+ -PPase type II (*AVP2/AVPL1*) ซึ่งในลำดับกรดอะมิโนของ AVP2/AVPL1 มีความคล้ายคลึงกับ AVP1 อยู่ 35 % แต่โปรตีนชนิดนี้จะพบอยู่ที่เยื่อหุ้มของกอลจิบอดี (Golgi body) ซึ่งต่างจาก AVP1 ที่จะอยู่บริเวณเยื่อหุ้มของแวคิวโอล (Sarafian *et al.*, 1992; Mitsuda *et al.*, 2001) โดยจากการศึกษาในต้น *Arabidopsis* พบว่ายีน *AVP1* มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช (Li *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005)



ภาพที่ 8 แสดงตำแหน่งของโปรตีนขนส่งโปรตอนในเซลล์พืช ประกอบด้วยโปรตีน P-type H^+ -ATPase แสดงในวงรีสีน้ำเงินเข้ม โปรตีน V-type H^+ -ATPase แสดงในวงรีสีชมพู และโปรตีน V-type H^+ -PPase แสดงในวงรีสีส้ม

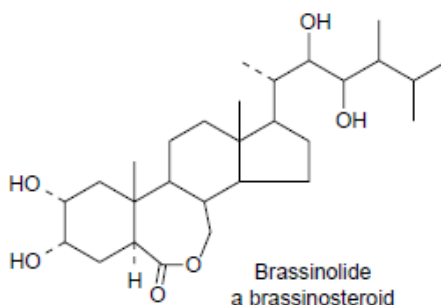
การศึกษาหน้าที่ของยีน *AVP1* ในพืชพบว่า การเพิ่มการแสดงออกของยีน *AVP1* มีผลต่อการทนความเค็มของต้น *Arabidopsis* ซึ่งน่าจะเป็นผลของการเพิ่มการดึงโปรตอนเข้าสู่แวคิวโอลมากขึ้นทำให้เซลล์พืชมีความเครียดลดน้อยลง (Gaxiola *et al.*, 2001) นอกจากนี้ในพืชอีกหลายชนิดเมื่อมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *AVP1* ทำให้พืชทนต่อความแห้งแล้งได้อีกด้วย (Kumar *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2005; Pasapula *et al.*, 2010) ผลของการแสดงออกของยีน *AVP1* ที่มากขึ้นนอกจากจะทำให้พืชทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้แล้ว ยังมีรายงานอีกว่ายีน *AVP1* มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของพืช การศึกษาการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *AVP1* ใน *Arabidopsis* ส่งผลให้ต้น *Arabidopsis* มีการสร้างใบจำนวนมากขึ้น และขนาดพื้นที่ของใบเพิ่มขึ้นถึง 40% เมื่อเทียบกับต้น wild-type และผลของฟิโนไทป์ในรากพบว่ามีน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นได้ถึงเกือบ 10 เท่ากว่าปกติ โดยผลที่เกิดขึ้นนั้นเนื่องมาจากการกระตุ้นของกลไก cell proliferation ในต้น *AVP1* overexpressor transgenic (Li *et al.*, 2005) ซึ่งการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการขยายขนาดของอวัยวะที่ตรวจพบนั้นเกิดขึ้นจากการเพิ่มประสิทธิภาพการขนส่งฮอร์โมนกลุ่มออกซิน โดยการทำงานของโปรตีน AVP1 ซึ่งจากการศึกษาความสัมพันธ์ของออกซินกับโปรตีน AVP1 โดยการถ่ายโอนยีนติดตามผล *DR5::GUS* ที่มีการตอบสนองต่อออกซิน เข้าสู่ต้น *Arabidopsis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *AVP1* (*avp1*) ทำให้การแสดงออกของยีน *AVP1* ลดลง เมื่อตรวจสอบสัญญาณ

GUS ในรากของต้น *avp1* ที่กลายพันธุ์พบว่าเนื้อเยื่อเจริญของรากไม่มีสัญญาณของ GUS อยู่ แสดงว่ามีปริมาณออกซินที่ลดลงในรากของต้น *avp1* เมื่อวัดปริมาณการขนส่งออกซินในปลายรากพบว่าต้น *avp1* มีปริมาณการขนส่งลดลง 27% เมื่อเทียบกับต้นปกติ ในทางกลับกันต้น *Arabidopsis* ที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *AVP1* มีปริมาณการขนส่งออกซินมากกว่าต้นปกติ 46% (Li *et al.*, 2005) ศักยภาพของยีน *AVP1* ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชยังได้ถูกแสดงในมะเขือเทศ ซึ่งผลของการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *AVP1* ส่งผลให้การเจริญเติบโตของรากนั้นถูกกระตุ้นทำให้มวลน้ำหนักแห้งของรากเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Park *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2014) นอกจากนี้ Yang *et al.* (2014) ทำการศึกษาปริมาณการขนส่งออกซินของมะเขือเทศที่มีการเพิ่มแสดงออกของยีน *AVP1* พบปริมาณการขนส่งออกซินสูงกว่าพันธุ์ปกติอีกด้วย

กระบวนการขนส่งออกซินในเซลล์พืช สามารถขนส่งออกซินในรูป IAAH ที่ไม่มีประจุผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบเซลล์ต่อเซลล์ (cell-to-cell movement) โดยอาศัยแรงดัน chemiosmotic ซึ่งเกิดจากความต่างของระดับโปรตอน (proton gradient) ทำให้เกิดความต่างของระดับความเป็นกรดเป็นด่าง ระหว่างไซโทพลาสซึม (cytoplasm) กับของเหลวระหว่างช่องว่างของเยื่อหุ้มเซลล์กับผนังเซลล์ (extracellular) โดยในสถานะที่ของเหลวระหว่างช่องว่างของเยื่อหุ้มเซลล์กับผนังเซลล์ เป็นกรด (pH = 5.5) ออกซินจะอยู่ในรูปกรดอ่อน (IAAH) ซึ่งสามารถเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ไซโทพลาสซึมซึ่งมีสถานะเป็นกลาง (pH = 7) ด้วยการแพร่ (passive diffusion) (Thuillier *et al.*, 2014) ด้วยเหตุนี้การรักษาระดับของโปรตอนในเซลล์พืชจึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการขนส่งออกซิน ดังนั้นกลุ่มโปรตีนขนส่งโปรตอนจึงมีส่วนสำคัญในการรักษาระดับโปรตอนของเซลล์ โดยโปรตีน H^+ -ATPase ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะทำการส่งโปรตอนจากไซโทพลาสซึมไปสู่บริเวณช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์กับผนังเซลล์ ทำให้เซลล์รักษาระดับค่า pH ที่เป็นกลางภายในเซลล์ และความเป็นกรดในบริเวณช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์กับผนังเซลล์ไว้ได้ ส่วนโปรตีน H^+ -PPase ที่อยู่บนเยื่อหุ้มแวคิวโอล จะทำการดึงเอาโปรตอนจากไซโทพลาสซึมเข้ามาเก็บไว้ในแวคิวโอล ทำให้ไซโทพลาสซึมคงสภาพความเป็นกลางไว้ได้ (Li *et al.*, 2005; Thuillier *et al.*, 2014) ผลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน AVP1 มีความสำคัญต่อกระบวนการขนส่งออกซิน ที่เป็นปัจจัยหนึ่งในกระบวนการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

3.2.2. บทบาทของยีน *EXO*

ยีน *EXORDIUM* (*EXO*) ถูกพบโดย Farrar *et al.* (2003) ว่ามีการแสดงออกในบริเวณที่มีการแบ่งตัวสูงเช่น เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ปลายราก และใบอ่อน เป็นต้น ยีน *EXO* เป็นหนึ่งใน gene family ที่มีสมาชิกยีนจำนวน 8 ยีน ในต้น *Arabidopsis* ซึ่งมีการแสดงออกเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์กับผนังเซลล์ (extracellular protein) (Schroder *et al.*, 2009) การศึกษาหน้าที่ของโปรตีน *EXO* พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของพืชผ่านกลไกการส่งสัญญาณของ brassinosteroids (Coll-Garcia *et al.*, 2004; Schroder *et al.*, 2009)



ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร Brassinolide ซึ่งเป็นหนึ่งในสารกลุ่ม Brassinosteroids (BRs) ที่ถูกค้นพบครั้งแรก

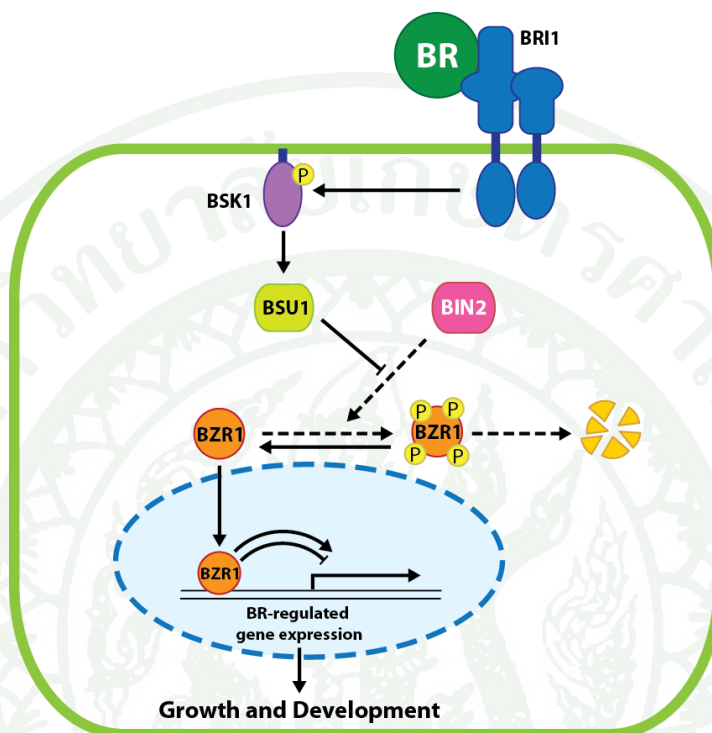
ที่มา: Heldt and Piechulla 2011

Brassinosteroids (BRs) เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม polyhydroxysteroids ถูกจัดให้เป็นหนึ่งในกลุ่มของฮอร์โมนพืช ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Mitchell *et al.* 1970 ในละอองเรณูของต้นผักกาดกานขาว (rapeseed, *Brassica napus*) สารตัวแรกที่พบมีชื่อว่า brassinolide (BL) หรือ Brassin (ภาพที่ 9) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช จากการศึกษาหน้าที่ของ BRs ในต้น *Arabidopsis* โดยการให้สาร brassinosteroid จากภายนอกในรูปแบบ 24-Epibrassinolide (EBL) พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรากให้เกิดการยืดยาวออก แต่รากจะถูกยับยั้งการเจริญเมื่อมีความเข้มข้น EBL สูง (Mussig *et al.*, 2002) นอกจากนี้ในต้น *Arabidopsis* ที่เกิดการกลายในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ brassinosteroid เช่น *dwf4* (Azpiroz *et al.*, 1998; Choe *et al.*, 1998) ส่งผลให้ต้น *Arabidopsis* อยู่ในสถานะแคระแกร็น (dwarfism) มีใบที่เล็กลง ออกดอกช้าและเป็นหมัน ซึ่งการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชด้วย BRs จะอาศัยกลไกการส่งต่อ

สัญญาณภายในเซลล์พืช (brassinosteroid signal transduction) (ภาพที่ 10) โดยการส่งสัญญาณจะเริ่มจากการรับสัญญาณของโปรตีน BRI1 ที่ผิวของเซลล์ทำให้เกิดการทำงานของ kinase domain กระตุ้นระบบส่งสัญญาณอื่นภายในเซลล์ (Kinoshita *et al.*, 2005) โดยเป้าหมายสุดท้ายของการส่งสัญญาณจะทำให้เกิดการจับกันระหว่าง BZR1 ที่มีคุณสมบัติเป็น transcription factor กับยีนเป้าหมายที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ BRs (BR-responsive gene) ซึ่งยีนกลุ่มนี้เมื่อเกิดการแสดงออกจะส่งผลให้เกิดการตอบสนองของพืชต่อ BRs (He *et al.*, 2005) แต่ในสถานะที่ไม่มี BRs โปรตีน BZR1 จะถูกเติมหมู่ phosphate ด้วยโปรตีน BIN2 ทำให้ BZR1 ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ และถูกทำให้สลายไป (Gampala *et al.*, 2007) แต่เมื่อใดก็ตามที่โปรตีน BRI1 รับสัญญาณจาก BRs จะส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณของ BRI1 ด้วยการเติมหมู่ phosphate ให้แก่โปรตีน BSK1 ทำให้ไปกระตุ้นโปรตีน BSU1 phosphatase ให้เติมหมู่ phosphate ที่โปรตีน BIN2 ทำให้ BIN2 ไม่สามารถขัดขวางการทำงานของ BZR1 ได้ BZR1 จึงสามารถไปจับกับดีเอ็นเอได้ตามปกติ เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Kim *et al.*, 2009) ซึ่งกลุ่มยีนเป้าหมายที่ BZR1 ไปควบคุมการแสดงออกมีหลายกลุ่ม ทั้งกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ BRs กลุ่มยีนในกลไกการส่งสัญญาณ และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกของเซลล์ที่ทำให้เกิดการเจริญของพืช ซึ่งหนึ่งในนั้นคือยีน *EXO* ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการขยายขนาดของเซลล์พืช (Sun *et al.*, 2010)

การศึกษาหน้าที่ของยีน *EXO* นั้นพบว่ามีแสดงออกในบริเวณที่มีการแบ่งเซลล์ในอัตราสูง เช่น ใบอ่อน ยอด และราก โดยการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *EXO* ด้วยกระบวนการ gene overexpression นั้นส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเจริญเติบโตในต้นพืช ทำให้มีจำนวนและพื้นที่ของใบที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งมวลของรากที่มากขึ้นกว่าต้น wild-type อย่างชัดเจน (Coll-Garcia *et al.*, 2004) ซึ่งการเพิ่มขนาดของใบพบว่าจะเกิดจากกระบวนการขยายขนาดของเซลล์ (cell expansion) นอกจากนี้การศึกษาลักษณะของต้น *Arabidopsis* ที่เกิดการกลายที่ยีน *EXO* (*exo* knock-out mutant) พบว่าส่วนยอดมีน้ำหนักแห้งที่ลดลงเมื่อเทียบกับ wild-type และเมื่อเปรียบเทียบความยาวของรากกับ wild-type พบว่ารากของต้น *exo* สั้นกว่า wild-type รวมทั้งพื้นที่ของใบมีขนาดลดลงด้วย (Schroder *et al.*, 2009) จากการวิเคราะห์พบว่ายีน *EXO* นั้นตอบสนองต่อฮอร์โมนกลุ่ม BRs ที่มีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Mussig *et al.*, 2002) จากการศึกษาการลดหรือเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *EXO* พบว่ายีน *EXO* มีผลควบคุมการแสดงออกของยีน *EXP5* และยีน *KCSI* (Coll-Garcia *et al.*, 2004; Schroder *et al.*, 2009) ซึ่งโปรตีน eapansins (*EXP5*) มีส่วนสำคัญต่อการขยายของผนังเซลล์ (Cosgrove, 2005) ส่วนโปรตีน fatty acid elongase (*KCSI*) มีหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันใน vegetative tissue (Todd *et al.*, 1999) แสดงให้เห็นว่ายีน *EXO* ได้รับสัญญาณจากฮอร์โมนกลุ่ม BRs และส่งต่อไปยังยีนเป้าหมายในเครือข่ายควบคุมการ

เจริญเติบโตของพืช เพื่อกระตุ้นกระบวนการขยายขนาดของอวัยวะ ทั้งนี้บทบาทการทำงานของยีน *EXO* มีความคล้ายคลึงกับยีน *ARL* ในกลุ่ม *ARGOS* ที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของอวัยวะต่างๆ ในพืชโดยผ่านสัญญาณจากฮอร์โมนกลุ่ม BRs เช่นกัน (Hu *et al.*, 2006)



ภาพที่ 10 แสดงกระบวนการส่งสัญญาณของ brassinosteroid (brassinosteroid signal transduction) ภายในเซลล์พืช ซึ่งกลไกการส่งสัญญาณจะเริ่มจากการจับกันของ brassinosteroid (BR; วงกลมสีเขียวเข้ม) กับโปรตีน BRI1 (รูปสีน้ำเงินเข้ม) ทำให้เกิดกระบวนการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ประกอบไปด้วยโปรตีน BSK1 (วงรีสีม่วง) โปรตีน BSU1 (สี่เหลี่ยมสีเขียวอ่อน) โปรตีน BIN2 (สี่เหลี่ยมสีชมพู) และโปรตีน BZR1 (วงกลมสีส้ม) ซึ่งในการส่งสัญญาณจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมหมู่ phosphate (วงกลมสีเหลือง) ในโปรตีนบางตัวเพื่อควบคุมการทำงาน โดยกลไกที่เกิดจากการกระตุ้นของ brassinosteroids ถูกแสดงในลูกศรทึบ ส่วนกลไกที่เกิดจากสภาวะไม่มี brassinosteroids ถูกแสดงในลูกศรประ

3.2.3. บทบาทของยีน *MRB1*

ยีน *MRB1* ถูกพบในพืชแม่แบบ *Arabidopsis* โดยโปรตีนที่ถูกแปลรหัสว่ามีลักษณะเป็น membrane protein ที่พบมากบนเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช มีการแสดงออกที่โดดเด่นในอวัยวะที่มีการเจริญเติบโต เช่น ยอด ดอกอ่อน ลำต้นอ่อน และราก ซึ่งเมื่อทำการถ่ายโอนยีนเพื่อเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *MRB1* พบว่าพืชนั้นมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายโอนยีน โดยต้น *MRB1* overexpressor transgenic นั้นมีความสูงเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า มีจำนวนใบมากขึ้นมากกว่าปกติเกิน 2 เท่า และขนาดของใบที่ใหญ่ขึ้นประมาณ 2 เท่าเช่นกัน ในส่วนของรากนั้นพบว่ามีความหนาเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และในเมล็ดพบว่ามีความหนาใหญ่กว่าปกติถึง 30% ซึ่งผลที่เกิดขึ้นนั้นมาจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนของเซลล์ และเมื่อตรวจสอบในระดับอณูชีวโมเลกุล พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเจริญเติบโต เช่น *GRF5* ยีน *ANT* และยีน *ROT3* ล้วนมีระดับการแสดงออกของยีนสูงขึ้นใน *MRB1* overexpressor transgenic (Guan *et al.*, 2009) ซึ่งยีน *GRF5* มีการแสดงออกเป็น transcription factor โดยเมื่อเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนพบว่าต้น *Arabidopsis* ใบที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งเกิดมาจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์พืช (Kim *et al.*, 2003) ส่วน *ANT* เมื่อเพิ่มการแสดงออกมีผลให้ ลำต้น ใบ และ ดอก ของต้น *Arabidopsis* มีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ของพืชเช่นเดียวกัน (Mizukami and Fischer, 2000) ในส่วนของยีน *ROT3* ที่เป็นสมาชิกของกลุ่ม cytochrome P450 CYP90C1 family ซึ่งยีน *ROT3* มีผลในการควบคุมการเจริญเติบโตทางยาวของใบในต้น *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2002) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่ายีน *MRB1* มีผลควบคุมการเจริญเติบโตของพืช จากกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ผ่านการควบคุมการแสดงออกของยีนกลุ่มอื่นที่มีหน้าที่ควบคุมกลไกการเจริญเติบโตของพืช (Guan *et al.*, 2009) ซึ่งยังไม่มียางานที่แน่ชัดถึงกลไกการควบคุมดังกล่าว

จากการศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีน *AVP1 EXO* และ *MRB1* ที่เป็นสมาชิกของกลุ่มยีน IYGs ในพืชแม่แบบ แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 ยีน มีอิทธิพลต่อกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช ผ่านการควบคุมกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ของอวัยวะต่างๆ ซึ่งจะเห็นได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ส่งผลให้อวัยวะต่างๆมีขนาดใหญ่อย่างเห็นได้ชัด และเป็นไปได้ว่าหน้าที่ของยีนอาจได้ถูกอนุรักษ์ไว้ในระบบวิวัฒนาการของพืช เช่น กรณีของยีน *AVP1* ในมะเขือเทศและ *Arabidopsis* ดังนั้นยีนเหล่านี้และกลไกการทำหน้าที่ที่อาจพบได้ในพืชต่างๆ ซึ่งในกรณีของมันสำปะหลังเป็นไปได้ว่ายีนทั้ง 3 กลุ่มอาจมีบทบาทหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการพัฒนารายขนาดของรากสะสมอาหารในมันสำปะหลังเช่นกัน ด้วยเหตุนี้จึงมีเป้าหมายในการทำการศึกษา

หน้าที่ทั้ง 3 ยีนในมันสำปะหลัง เพื่อให้ทราบถึงกลไกหน้าที่ของกลุ่มยีนเหล่านี้ต่อกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง

4. การศึกษาหน้าที่ของยีนในจีโนมพืช

ในปัจจุบันนักวิจัยสามารถที่จะทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมพืชแม่แบบ *Arabidopsis* ได้ทั้งหมด ทำให้สามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาศึกษาวิจัยในระดับอนุพันธุศาสตร์ เพื่อที่จะเข้าใจเครือข่ายของยีนที่มีผลต่อกลไกการควบคุมกลไกต่างๆภายในพืช (Rounsley and Briggs, 1999; Brent, 2000) รวมไปถึงกลไกการควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืชด้วย แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวไม่สามารถครอบคลุมในกลไกบางอย่างที่ไม่พบในต้น *Arabidopsis* ได้ ดังนั้นจีโนมในพืชแม่แบบอื่นจึงได้ถูกศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มข้อมูลความรู้ของโครงข่ายยีนในบางกลไกที่ไม่พบในต้น *Arabidopsis* ซึ่งในพืชหลายชนิดสามารถที่จะทราบข้อมูลจีโนมทั้งหมดได้แล้วเช่นกัน เช่น ข้าว ข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งในอนาคตข้อมูลจีโนมทั้งหมดในพืชที่สำคัญอื่นๆ จะสามารถถูกศึกษาและระบุลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากในปัจจุบันการพัฒนาของเครื่องมือและเทคนิคต่างๆมีมากมายขึ้น โดยเฉพาะเทคนิค high-throughput เช่นการทำ high-throughput sequencing และเทคนิค DNA microarray ทำให้นักวิจัยสามารถได้รับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมเป้าหมายเป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น เทคนิคเหล่านี้จึงเป็นเทคนิคสำคัญที่จะนำทางให้นักวิจัยค้นพบกลไกการทำงานของยีนต่างๆ ในจีโนมพืชได้อย่างสมบูรณ์ แต่เทคนิค high-throughput เหล่านี้มีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง ทำให้การใช้เทคนิคเหล่านี้ถูกจำกัดด้วยต้นทุนที่สูง ทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถศึกษาและระบุโครงสร้างของยีนได้โดยตรง จะอาศัยกระบวนการโคลนยีนเพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และโครงสร้างของยีนที่จำเพาะ ซึ่งกระบวนการศึกษาดังกล่าวจะทำความเข้าใจเกี่ยวกับการศึกษาวิเคราะห์หน้าที่ของยีน ซึ่งการเพิ่มและลดระดับการแสดงออกของยีนเพื่อติดตามผลกระทบของยีนต่อลักษณะต่างๆ ในพืช เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาหน้าที่ของยีนเป้าหมาย (Bouchez and Hofte, 1998)

กระบวนการเพิ่มการแสดงออกของยีนเป็นวิธีการศึกษาหน้าที่ของยีนแบบจำเพาะ ซึ่งอาศัยการควบคุมยีนเป้าหมายผ่านโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของยีน โปรโมเตอร์หนึ่งที่มีประสิทธิภาพที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือ CaMV 35S โปรโมเตอร์จาก cauliflower mosaic virus (CaMV) โปรโมเตอร์ชนิดนี้เป็นโปรโมเตอร์แบบ constitutive ที่มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อของพืช ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการแสดงออกของยีน (Franck *et al.*, 1980) แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนปริมาณสูงในทุกส่วนของพืชอาจจะส่งผลเสียต่อการ

เจริญเติบโตของพืชได้ รวมถึงการแสดงออกสูงในทุกส่วนของพืชทำให้ไม่สามารถตรวจสอบผลกระทบของยีนต่อส่วนที่ต้องการตรวจสอบจริงๆ ได้ ซึ่งการศึกษาหน้าที่ของยีนในพืชสามารถศึกษาได้แบบจำเพาะ โดยอาศัยโปรโมเตอร์ที่สามารถแสดงออกได้จำเพาะกับอวัยวะพืช ดังนั้นการศึกษาหน้าที่ของยีนในมันสำปะหลังจึงต้องศึกษาควบคุมกันระหว่างโปรโมเตอร์ 35S และโปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกจำเพาะกับอวัยวะสะสมอาหาร โดยโปรโมเตอร์หนึ่งที่สามารถจะทำให้ยีนเป้าหมายแสดงออกได้จำเพาะกับอวัยวะสะสมอาหารของพืชคือโปรโมเตอร์ของยีน Patatin ซึ่งยีนนี้จะแสดงออกเป็นโปรตีนในกลุ่ม glycoproteins ที่พบเป็นสัดส่วน 40% ในโปรตีนจากหัวของมันฝรั่ง ซึ่งจะพบในมันฝรั่งอยู่ 2 ชนิด คือ Class I patatin ซึ่งมีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 22 ตัวที่บริเวณ 5'UTR พบว่ามีการแสดงออกจำเพาะที่หัวมันฝรั่ง และ Class II patatin ที่ไม่มีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ ในบริเวณ 5'UTR พบว่ามีการแสดงออกทั้งในรากและหัวของมันฝรั่ง (Kim *et al.*, 2008) ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าโปรโมเตอร์ของ patatin จากมันฝรั่งสามารถที่จะนำมาใช้ควบคุมการแสดงออกของยีนให้จำเพาะกับอวัยวะสะสมอาหารอื่นได้ ดังเช่นการศึกษาของ Ihemere *et al.* (2006) ได้ใช้โปรโมเตอร์ patatin เพื่อการศึกษาการแสดงออกของยีนที่จำเพาะในรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง ดังนั้นกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนสามารถใช้โปรโมเตอร์ CaMV 35S ที่มีการเพิ่มการแสดงออกสูง และโปรโมเตอร์ patatin ที่สามารถควบคุมการแสดงออกจำเพาะกับอวัยวะสะสมอาหาร ในการศึกษาหน้าที่ของยีนในพืชที่สร้างอวัยวะสะสมอาหาร เช่น มันฝรั่ง และมันสำปะหลังได้

5. การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช

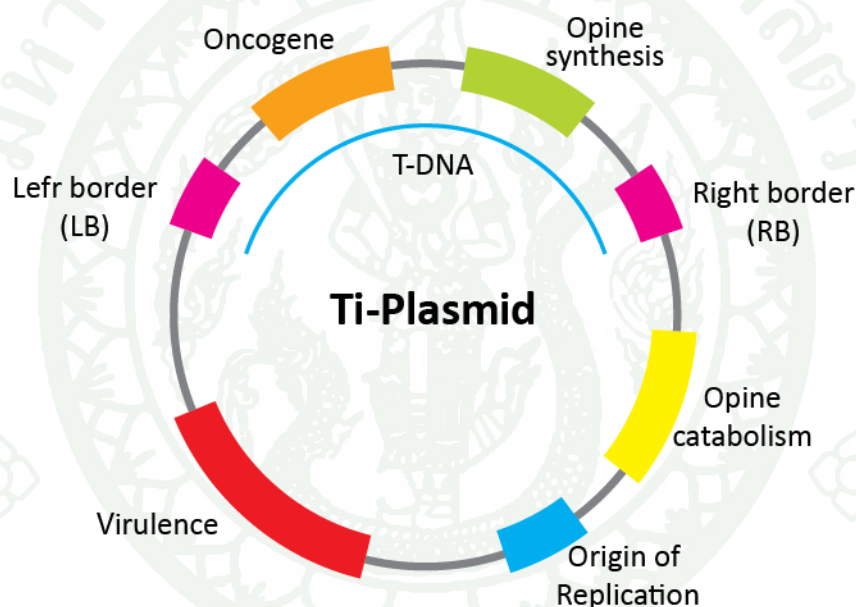
กระบวนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชเป็นกระบวนการที่สำคัญสำหรับการศึกษายาทาหน้าที่ของยีนต่อกระบวนการต่างๆ ในพืช ซึ่งกรรมวิธีการที่ใช้ในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชที่มีประสิทธิภาพและนิยมใช้ในปัจจุบันมีอยู่ 2 วิธี คือวิธีการถ่ายโอนยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-mediated genetic transformation) และวิธีการถ่ายโอนยีนโดยใช้การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์โดยเครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) แต่อย่างไรก็ตามการถ่ายโอนยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันมากกว่าเนื่องจากข้อได้เปรียบในการถ่ายโอนยีนของ *Agrobacterium* ที่สามารถถ่ายโอนยีนให้แสดงออกในพืชได้เสถียรมากกว่า และจำนวนซ้ำของยีน(copy) ที่ถ่ายโอนเข้าเซลล์พืชน้อยกว่า เมื่อเทียบกับเครื่องยิงอนุภาคที่มีปัญหาเรื่องจำนวนชุดของยีนที่ถ่ายเข้าสู่พืช (Shou *et al.*, 2004) ซึ่งจำนวนชุดของยีนเป็นเรื่องสำคัญที่จะอาจมีผลต่อการหยุดการแสดงออกของยีน (gene silencing) ทำให้ยีนไม่แสดงออกในต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนไปแล้ว

ด้วยเหตุนี้ *Agrobacterium* จึงนิยมใช้เป็นทางเลือกแรกที่จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนในพืช

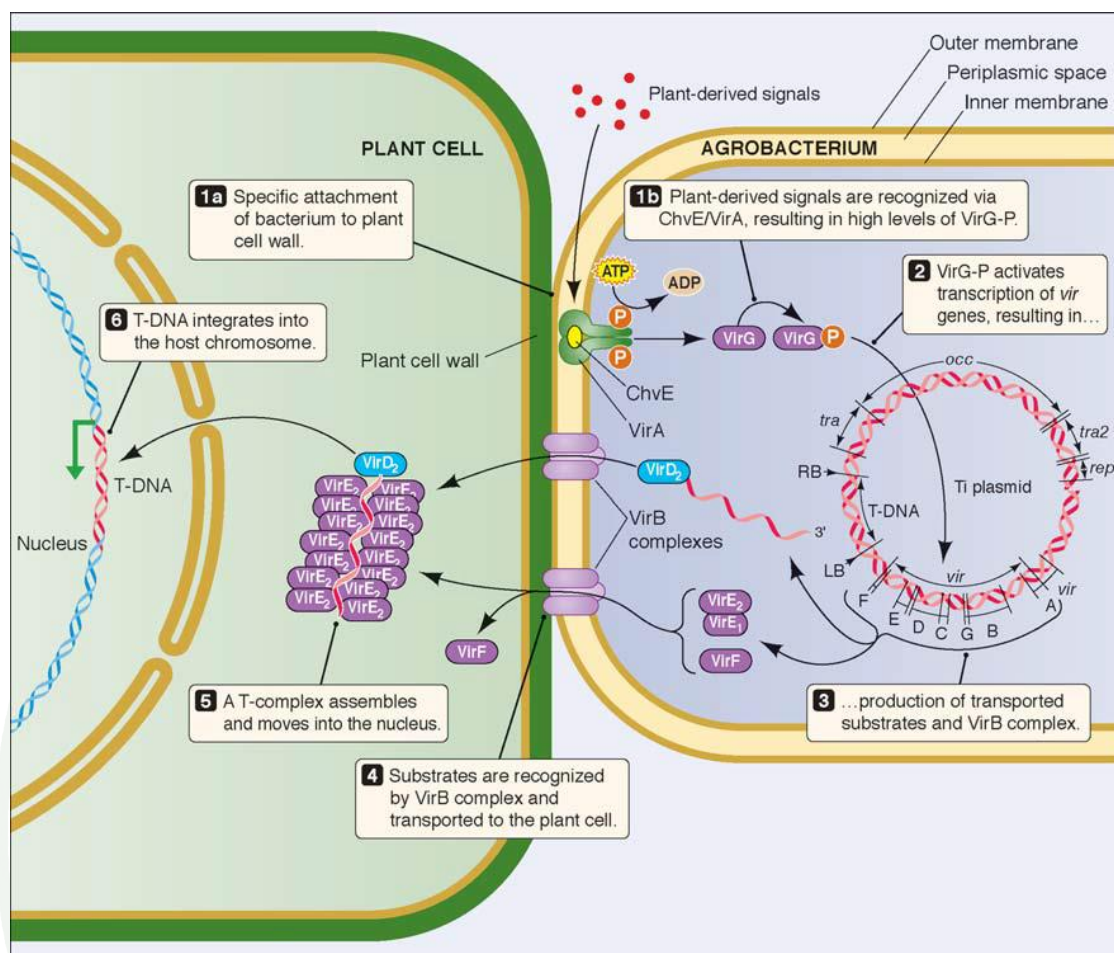
Agrobacterium tumefaciens เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค crown-gall ในพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิดพบอยู่ในดิน *A. tumefaciens* มีความสามารถในการถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่เรียกว่า T-DNA ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ tumor-inducing plasmid (Ti-plasmid) (ภาพที่ 11) เข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ของพืช ซึ่งชิ้นส่วน T-DNA จะแทรกเข้าไปในจีโนมของพืชที่แบคทีเรียเข้าไปอาศัยอยู่ หลังจากนั้น T-DNA จะอาศัยเอนไซม์และสารต่างๆจากเซลล์พืชเพื่อการแสดงออกยีนที่อยู่ภายใน T-DNA เป็นผลให้เกิดโรค crown-gall ในพืช (Nester *et al.*, 1984; Binns and Thomashow, 1988) T-DNA ประกอบด้วยยีน 2 ชนิด คือ oncogenic genes เป็นยีนที่แสดงออกเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ออกซิน และ ไชโตไคนิน ที่ก่อให้เกิดการสร้างเซลล์เนื้องอก (tumor formation) ในเนื้อเยื่อพืชเกิดเป็นลักษณะของโรค crown-gall ยีนอีกชนิดหนึ่งที่ *A. tumefaciens* ถ่ายโอนเข้าไปในพืชคือยีนที่แสดงออกเป็นสารกลุ่ม opines ซึ่งสารนี้เป็นสารที่แบคทีเรียบังคับให้พืชสร้างขึ้นในเซลล์บริเวณที่เกิดโรค crown-gall ที่ *A. tumefaciens* ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน (Hooykaas and Schilperoort, 1992; Zupan and Zambryski, 1995) ส่วนยีนที่อยู่นอกขอบเขตของ T-DNA ซึ่งไม่ได้ถูกส่งไปภายในเซลล์พืช จะมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายสาร opines (opine catabolism) และกลุ่มยีนอีกกลุ่มหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนและแทรกชิ้นส่วน T-DNA เข้าสู่จีโนมของพืชเรียกกลุ่มยีนนี้ว่ากลุ่มยีน virulence (*vir*) ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญที่ทำให้ *A. tumefaciens* ถูกนำมาใช้ในกระบวนการศึกษาทางพันธุวิศวกรรมเพื่อถ่ายโอนยีนเป้าหมายเข้าสู่พืช

การเข้าบุกรุกพืชของ *A. tumefaciens* เกิดจากการปล่อยสาร phenolic จากบาดแผลของพืช ทำให้กระตุ้นยีนกลุ่ม virulence (*vir*) ที่อยู่ภายใน Ti-plasmid ก่อให้เกิดกระบวนการเข้าบุกรุกพืชของ *A. tumefaciens* การกระตุ้นของสาร phenolic จะกระตุ้นผ่านโปรตีนที่อยู่ที่ยึดหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนกลุ่ม Vir ชื่อว่า VirA การรับสัญญาณของ VirA จะส่งสัญญาณต่อไปยัง VirG ด้วยกระบวนการ phosphorylation ทำให้ VirG ทำหน้าที่เป็น Transcription factor กระตุ้นการแสดงออกของยีน *vir* อื่นๆ (Jin *et al.*, 1990; Pan *et al.*, 1993) โปรตีน VirD1/VirD2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจดจำตำแหน่ง left border (LB) และ right border (RB) ที่เป็นขอบเขตของ T-DNA บน Ti-plasmid จะเข้ามาจับตรงบริเวณดังกล่าว และทำหน้าที่เป็น endonuclease ตัดส่วนท้ายของ LB และ RB แยกส่วน T-DNA ออกจาก Ti-plasmids หลังจากนั้น VirD2 จะจับบริเวณที่ปลาย 5' ของ T-DNA สายเดียวอยู่ในรูป ssT-DNA-VirD2 complex เพื่อป้องกันการถูกทำลายจาก

exonuclease ที่อยู่ในเซลล์ (Dürrenberger *et al.*, 1989) จากนั้นโปรตีนกลุ่ม VirB (VirB complex) ที่เป็น transmembrane protein จะรวมตัวสร้างเป็นช่องบริเวณ cell envelope ของแบคทีเรียเพื่อส่ง ssT-DNA-VirD2 complex เข้าไปสู่เซลล์พืช (Christie *et al.*, 2005) นอกจากนั้น โปรตีน VirE2 จะถูกส่งไปในเซลล์พืชผ่านทางช่องของ VirB complex เช่นกันเพื่อที่จะไปจับครอบคลุมทั่วสาย T-DNA ของ ssT-DNA-VirD2 complex เพื่อป้องกันการทำลายของเอนไซม์ภายในเซลล์พืช (Zupan and Zambryski, 1995) ปกติในเซลล์พืชจะมีโปรตีนที่เป็น receptors ทำหน้าที่ชักนำโปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสซึมเข้าไปในนิวเคลียส ซึ่งโปรตีน VirE2 และ VirD2 ที่อยู่บน ssT-DNA มีตำแหน่ง nuclear location signal (NLS) ซึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของ receptors ดังกล่าว ทำให้เกิดการชักนำเอา ssT-DNA เข้าสู่ นิวเคลียสพืช และแทรกขึ้น ssT-DNA ไปในจีโนมพืชแบบสุ่ม (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 11 แผนภาพแสดงโครงสร้างของ Tumor-inducing plasmid (Ti-plasmid) ที่พบอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ซึ่งสามารถที่จะถ่ายโอนส่วนของ T-DNA (บริเวณเส้นสีฟ้า) เข้าสู่พืช องค์ประกอบของ Ti-plasmid ประกอบด้วย origin of replication (Ori; แถบสีฟ้า) opine catabolism (แถบสีเหลือง) ยีน virulence (แถบสีแดง) left border และ right border (LB และ RB; แถบสีชมพู) ยีน oncogenic (แถบสีส้ม) และยีน Opine synthesis (แถบสีเขียว)



ภาพที่ 12 แผนภาพแสดงกลไกการถ่ายโอน T-DNA จากแบคทีเรีย *A. tumefaciens* เข้าสู่เซลล์พืชผ่านกลไกการทำงานของโปรตีน Vir ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens*

ที่มา: McCullen and Binns (2006)

6. พืชแม่แบบมันฝรั่ง

มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) เป็นพืชที่มีการสะสมสารอาหารจำพวกแป้ง โปรตีน และวิตามินไว้ในหัวใต้ดิน อวัยวะสะสมอาหารของมันฝรั่งไม่ได้พัฒนามาจากราก แต่เป็นการพัฒนามาจากลำต้นที่อยู่ใต้ดิน (stolon) ระยะเริ่มแรกของการพัฒนาหัวมันฝรั่งจะเกิดการหยุดการพัฒนาคีตาของลำต้นใต้ดิน และเริ่มการพองขยายด้านข้างของหัวมันฝรั่ง (Ferne and Willmitzer, 2001) ปัจจัยที่กระตุ้นการเกิดกระบวนการสร้างหัวของมันฝรั่งประกอบด้วย ความยาวของช่วงวันสั้น phytochrome B ความเข้มแสงสูง ปริมาณน้ำตาลสูง อุณหภูมิต่ำ และระดับไนโตรเจนต่ำ (Jackson, 1999) ในสถานะที่ไม่ถูกกระตุ้นการสร้างหัว ลำต้นใต้ดินจะเจริญตามแนวนานกับดิน และมีการพัฒนาออกมาเป็นยอดใหม่ในที่สุด ในระหว่างที่ลำต้นใต้ดินอยู่ในสถานะไม่ถูกกระตุ้น ลำต้นใต้ดินจะมีกระบวนการเจริญเติบโตเหมือนลำต้นปกติ มีการสร้างรากสร้างใบและสร้างดอก เมื่อใดก็ตามที่ลำต้นใต้ดินอยู่ในสภาพแวดล้อมที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างหัว ลำต้นใต้ดินจะเกิดการเจริญเติบโตที่ช้าลง เนื้อเยื่อบริเวณด้านปลายของลำต้นใต้ดินจะเกิดการบวม และโครงสร้างของลำต้นใต้ดินจะเปลี่ยนไปเพื่อที่จะพัฒนาเป็นหัวสะสมอาหารต่อไป (Rodriguez-Falcon *et al.*, 2006) ซึ่งการพองของปลายลำต้นใต้ดินเป็นผลมาจากการขยายขนาดของเซลล์ และแบ่งเซลล์ในแนวรัศมีของเซลล์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อบริเวณ pith และ cortex (Xu *et al.*, 1998)

ถึงแม้ว่าการเกิดหัวของมันฝรั่งจะไม่ได้พัฒนามาจากรากเหมือนกับรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง แต่อย่างไรก็ดีพืชทั้งสองชนิดมีกลไกที่พัฒนาอวัยวะให้มีหน้าที่ในการสะสมอาหารเช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นไปได้ที่พืชทั้งสองชนิดจะมีกลไกของยีนและกระบวนการพัฒนาอวัยวะสะสมอาหารที่คล้ายคลึงกัน (Ku *et al.*, 2008) เช่น ปัจจัยจากสถานะแวดล้อมในการสร้างหัว และรากสะสมอาหาร จะเกิดการสร้างในสถานะที่มีอุณหภูมิต่ำ และในสถานะวันสั้นเหมือนกัน มีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน และไซโตไคนินเช่นเดียวกัน (Wilson and Lowe, 1973) และด้วยความได้เปรียบในการกระบวนการถ่ายโอนยีนของมันฝรั่งที่ทำให้ทำได้ง่ายและใช้เวลาสั้นกว่า สามารถตรวจสอบผลได้รวดเร็วกว่า เนื่องจากมันฝรั่งมีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคในการถ่ายโอนยีนที่มีประสิทธิภาพมากกว่าในมันสำปะหลัง ด้วยเหตุนี้มันฝรั่งจึงถูกเลือกให้เป็นพืชแม่แบบในการศึกษาหน้าที่ของยีนเป้าหมายจากมันสำปะหลังในการศึกษานี้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1. รากสะสมอาหารมันสำปะหลังในระยะต่างๆ อายุ 2 3 และ 6 เดือน
2. ใบอ่อน, ใบแก่, ลำต้น และส่วนยอดของลำต้น ของต้นมันสำปะหลัง อายุ 2, 3 และ 6 เดือน
3. ConcertTM Plant RNA reagent (Invitrogen)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani, 1% Tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride, pH 7)
5. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YEP (10 กรัมต่อลิตร yeast extract, 10 กรัมต่อลิตร Bacto Peptone และ 5 กรัมต่อลิตร NaCl)
6. พลาสมิด pGEM[®]-T easy (Promega)

2. อุปกรณ์

1. หลอดสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์
2. หลอดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
4. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)
5. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
6. ชุดทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
7. เครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์
8. เครื่อง Gel Documentation
9. Nanodrop spectrophotometer
10. แผ่นฟิล์ม X-ray
11. แผ่นเมมเบรน

วิธีการ

1. การสืบหาถิ่นสมาชิกในกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* จากฐานข้อมูลจีโนมของมันสำปะหลัง

ทำการสืบหาถิ่นในกลุ่มเป้าหมาย *AVP1 EXO* และ *MRB1* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AtAVP1 AtEXO* และ *AtMRB1* จากพืชแม่แบบ *Arabidopsis thaliana* เพื่อหาถิ่นคู่เหมือนของยีนกลุ่มเป้าหมายดังกล่าวในพืชมันสำปะหลัง โดยการนำไป BLAST กับฐานข้อมูลจีโนมของมันสำปะหลัง (www.phytozome.net/cassava) เมื่อพบยีนคู่เหมือนในมันสำปะหลังแล้ว จึงนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนจากยีนคู่เหมือนดังกล่าวมาทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) แยกแต่ละกลุ่มยีนเป้าหมายเพื่อตรวจวิเคราะห์หาถิ่นสมาชิกในแต่ละกลุ่มที่มีความใกล้เคียงทางวิวัฒนาการกับยีน *AtAVP1 AtEXO* และ *AtMRB1* มากที่สุด ซึ่งน่าจะมีความใกล้เคียงทางหน้าที่ของยีนเช่นกัน

2. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน และการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการ

จากการสืบหาถิ่นกลุ่มเป้าหมายในมันสำปะหลังจะพบยีนคู่เหมือนของกลุ่มยีนเป้าหมาย *AVP1 EXO* และ *MRB1* ในแต่ละกลุ่มจำนวนหลายยีน ดังนั้นจึงนำสมาชิกยีนในแต่ละกลุ่มนั้นมาจำแนกโดยใช้แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการเพื่อหาถิ่นที่มีความใกล้เคียงกับยีน *AtAVP1 AtEXO* และ *AtMRB1* มากที่สุด การสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการจะอาศัยผลของการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของสมาชิกยีนในแต่ละกลุ่มของมันสำปะหลังกับยีนกลุ่มเดียวกันจากพืชแม่แบบ *Arabidopsis thaliana* โดยใช้โปรแกรม MEGA4 และสร้างแผนภาพแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการแสดงความใกล้เคียงกันภายในกลุ่มยีน

ยีนกลุ่ม *AVP1* และ *MRB1* ได้มีรายงานถึงโครงสร้างโปรตีนในต้น *Arabidopsis* เอาไว้ว่าเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็น transmembrane protein หรือ โปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นจึงอาศัยคุณสมบัติดังกล่าวของยีนสองกลุ่มนี้ ในการจำแนกสมาชิกยีนคู่เหมือนในมันสำปะหลัง ว่ายีนใดมีโครงสร้างโปรตีนที่สอดคล้องที่น่าจะเป็น transmembrane protein โดยใช้โปรแกรม TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) ในการคาดคะเนโครงสร้างของ transmembrane protein ของสมาชิกยีนในแต่ละกลุ่มและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อหาสมาชิกของยีนที่มีโครงสร้างสอดคล้องกับโครงสร้างโปรตีนของยีนกลุ่มดังกล่าวที่ได้มีรายงานไว้

3. การเก็บตัวอย่างมันสำปะหลัง

ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างจากมันสำปะหลังสายพันธุ์ไทยชื่อ สายพันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50 ปลูกลงที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดย ดร.โอภาส บุญเลี้ยง การเก็บตัวอย่างจะ เก็บจากส่วนของรากสะสมอาหารที่ระยะพัฒนาการ ตั้งแต่รากฝอย (fibrous root; Fi) รากที่เริ่มมีการ โป่งพองระดับที่ 1 ระดับที่ 2 (transition root; TR1 และ TR2) และรากสะสมอาหาร ในส่วนของราก สะสมอาหารจะเก็บในอายุที่แตกต่างกันที่ 2 3 และ 6 เดือน (storage root; 2SR, 3SR และ 6SR) ซึ่ง การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมันสำปะหลังเก็บรวมทั้งตัวอย่างของส่วนยอด (shoot apex; AP) ใบอ่อน (young leaf; YL) ใบแก่ (mature leaf; ML) และลำต้นส่วนบน (top stem; TS) โดยเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมันสำปะหลังที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างได้แสดงไว้ในภาพที่ 13 หลังจากเก็บเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เรียบร้อยแล้วในส่วนของรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังจะถูกนำมาทำการล้างทำความสะอาด และปอกเปลือกของหัวมันสำปะหลังออก แยกส่วนบริเวณเนื้อเยื่อชั้น cortex และเนื้อเยื่อชั้น parenchyma ของรากสะสมอาหารออกจากกัน และสับย่อยเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็กๆ บรรจุชิ้นส่วนที่ ได้ลงในหลอดพลาสติกปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นแล้วแช่แข็งเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว ทันที จากนั้นเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ส่วนต่างๆ ที่ได้เก็บรักษาไว้แล้วนั้น จะถูกนำไปใช้เพื่อตรวจสอบแบบแผนการแสดงออกของยีนต่างๆ ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR ส่วนในการโคลนยีนจะใช้เฉพาะส่วนของรากสะสมอาหารเพียงส่วนเดียว



ภาพที่ 13 แสดงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยเนื้อเยื่อส่วนยอด (shoot apex; AP) ใบอ่อน (young leaf; YL) ใบแก่ (mature leaf; ML) และลำต้นส่วนบน (top stem; TS) เนื้อเยื่อส่วนรากฝอย (fibrous root; Fi) รากที่เริ่มมีการโป่งพองระดับที่ 1 ระดับที่ 2 (transition root; TR1 และ TR2) และ รากสะสมอาหาร (storage root; SR) ซึ่งการเก็บตัวอย่างของรากสะสมอาหารจะเก็บแยกตามอายุ 2 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือน

4. การตรวจสอบแบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1*, *EXO* และ *MRB1* ของมันสำปะหลัง

4.1. การสกัด Total RNA

การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนกลุ่มเป้าหมายจะอาศัยกรรมวิธี semi-quantitative RT-PCR ทำการศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในอวัยวะต่างๆของพืชมันสำปะหลัง โดยการวัดระดับการแสดงออกจะอาศัยการวัดระดับผลผลิต transcription ของยีน ซึ่งก็คือ mRNA ดังนั้นจึงต้องทำการสกัด Total RNA จากตัวอย่างมันสำปะหลัง เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA ที่มีอยู่ใน total RNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่แบบผันกลับ (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR) ทั้งนี้ในการสกัด RNA จากมันสำปะหลังสิ่งที่สำคัญคือการระมัดระวังไม่ให้ RNA เกิดการสลายไปเนื่องจาก RNA สามารถที่จะสลายได้ง่ายในธรรมชาติ โดยเฉพาะการปนเปื้อนของ RNase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย RNA จากมือ สารเคมีหรืออุปกรณ์ในการสกัด RNA จะส่งผลให้ RNA ถูกสลายไปในระหว่างการสกัดได้ ดังนั้นก่อนการสกัด RNA จึงต้องทำการเตรียมอุปกรณ์และสารเคมีให้ปราศจากการปนเปื้อน RNase ก่อน ซึ่งการเตรียมสารละลายทั้งหมดในการสกัด RNA จะต้องใช้น้ำที่ปราศจาก RNase โดยการเติม 0.1 % diethylpyrocarbonate (DEPC) ลงในน้ำ deionized แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง ในส่วนของอุปกรณ์เครื่องแก้ว คีมหนีบ ไม้พาย โกร่ง และลูกโกร่ง จะนำไปอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อทำลายเอนไซม์ RNase และเนื่องจากหลังจากทำการสกัด RNA เรียบร้อยแล้ว จะต้องนำ RNA ที่ได้ไปผ่านกระบวนการเจลอเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบคุณภาพของ RNA ดังนั้น อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำเจลอเล็กโตรโฟรีซิสจึงจำเป็นต้องทำให้ปราศจาก RNase เช่นกัน โดยแช่อุปกรณ์ดังกล่าวไว้ใน 3 % hydrogen peroxide เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วย น้ำที่ผ่านการเติม DEPC แล้วจึงปล่อยให้แห้งให้แห้งก่อนนำไปใช้

หลังจากเตรียมอุปกรณ์ต่างๆพร้อมแล้วทำการสกัด RNA โดยนำโกร่งที่ผ่านการอบทำลายเอนไซม์ RNase แล้ว มาใช้บดเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังตามที่เก็บแยกเอาไว้แล้ว ดังที่ระบุข้างต้นในในโตรเจนเหลว จนกระทั่งเนื้อเยื่อมีลักษณะเป็นผงแป้งจึงถ่ายผงเนื้อเยื่อจากโกร่งสู่หลอดปราศจากเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร (Falcon tubes) และแช่หลอดลงในในโตรเจนเหลวทันที จากนั้นเติมสาร Concert™ Plant RNA reagent (Invitrogen) ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์สำหรับสกัด RNA ลงไปในหลอดที่มีผงเนื้อเยื่อเป็นปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรผงในหลอด เขย่าหลอดที่เติมสารละลาย

หรือ vortex จนกระทั่งผงเนื้อเยื่อละลายเข้ากับบัฟเฟอร์เป็นเนื้อเดียวกัน วางหลอดในแนวราบและ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 2,600 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการถ่ายบริเวณส่วนใสสู่หลอด ขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดใหม่ โดยระวังไม่ให้มีตะกอนด้านล่างติดขึ้นมา เมื่อได้ส่วนใสมาแล้วเติม 5M NaCl ที่เตรียมด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 0.2 เท่าของปริมาตรส่วนใส และเติมคลอโรฟอร์ม 0.6 เท่าของปริมาตรส่วนใส ทำการเขย่าหรือ vortex จนกระทั่งสารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกันจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 2,600 x g เป็นเวลา 30 นาที ทำการถ่ายสารบริเวณส่วนใสลงในหลอดใหม่อีกครั้ง และเติมคลอโรฟอร์มอีก 1 เท่าของปริมาตรส่วนใส และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 2,600 x g เป็นเวลา 20 นาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีก 2 ถึง 3 ครั้ง โดยส่วนใสในครั้งสุดท้ายจะนำไปตกตะกอน RNA ด้วยการเติมเอทานอลบริสุทธิ์ในปริมาตร 0.9 เท่าของปริมาตรส่วนใสและผสมโดยการกลับหลอดไปมาเบาๆทันทีเพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,600 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้งออกไปล้างตะกอน RNA ด้วย 75% เอทานอลที่เตรียมจากน้ำ DEPC นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิมเป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำ DEPC เมื่อตะกอนละลายแล้วให้ย้ายสารละลายลงในหลอดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม 10 M LiCl ปริมาตร 0.3 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันเบาๆ เพื่อไม่ให้ RNA เกิดการขาด จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน เพื่อช่วยให้ RNA ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เมื่อได้ตะกอน RNA เรียบร้อยแล้วทำการล้างตะกอน 2 ครั้ง โดยครั้งแรกล้างตะกอนด้วย 2.5 M LiCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ครั้งที่ 2 ทำการล้างตะกอน RNA ด้วย 75% เอทานอล 1 มิลลิลิตรเช่นกัน สุดท้ายทำการละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำ DEPC และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะใช้ในขั้นตอนถัดไป RNA ที่สกัดได้ข้างต้นจะถูกนำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo scientific) ด้วยความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร โดยอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ 260/280 และ 260/230 ต้องอยู่ในช่วง 1.8-2.0 Total RNA ที่ได้จึงจะมีความบริสุทธิ์สูงไม่มีการเจือปนของโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต สามารถนำไปใช้ในกระบวนการถัดไปได้ ส่วนค่าความเข้มข้นที่ได้จากการวัดจะนำมาคำนวณหาปริมาณของ RNA ที่จะใช้ในการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบคุณภาพของ RNA และนำไปคำนวณหาปริมาณของ RNA ที่ใช้เป็น RNA สายเริ่มต้นในการสร้าง cDNA ด้วยวิธีการ reverse transcription

4.2. การตรวจสอบคุณภาพ RNA

การตรวจสอบคุณภาพ RNA จะเป็นการตรวจสอบผลของการสกัด RNA ว่า RNA ที่ได้นั้นมีคุณภาพดีพอที่จะใช้ในการสร้างสาย cDNA หรือไม่ ซึ่งจะดำเนินการด้วยวิธี ฟอรัมาลดีไฮด์ อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (formaldehyde agarose gel electrophoresis) ที่มีการเติมฟอรัมาลดีไฮด์ (formaldehyde) ลงไปในตัวอย่าง RNA ที่ใช้เพื่อป้องกันการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของ RNA ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวจะไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของ RNA ในเจลอะกาโรส ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์คุณภาพของ RNA ได้ การเตรียมเจลใช้เจล 1.2 % มวล/ปริมาตร ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งเจลอะกาโรสน้ำหนัก 1.2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียสแล้ว จากนั้นเติม 10X MOPS (200 mM MOPS, 80mM sodium acetate, 10 mM EDTA; pH8.0) ลงในขวดรูปชมพู่ดังกล่าว และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DEPC ทำการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจนกระทั่งเจลอะกาโรสละลายจนหมดจึงเติม 37% formaldehyde ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน เทลงในถาดเตรียมเจลทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว โดยตัวอย่าง RNA ที่ใช้จะใช้ปริมาณประมาณ 1 ไมโครกรัม และก่อนที่จะโหลดตัวอย่าง RNA ทำการเติม 5X RNA loading buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงไปผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นลงโดยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงนำตัวอย่าง RNA ที่ผ่านการบ่มแล้วโหลดลงเจลอะกาโรสที่เตรียมไว้ที่วางอยู่ใน 1X MOPS จากนั้นทำการเปิดเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสที่กําลังไฟ 50V โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที และนำไปวิเคราะห์ผลภายใต้แสง UV ในเครื่อง gel documentation

4.3. การสังเคราะห์สาย cDNA

RNA ที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพด้วยกรรมวิธีเจลอิเล็กโตรเฟรีซิสแล้ว จะถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์สาย cDNA ซึ่งขั้นตอนนี้จะใช้ชุดทดลอง SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) ในการสร้างสาย cDNA สายแรก (First-stand cDNA) โดยใช้ปริมาณ RNA ตั้งต้นที่ 5 ไมโครกรัม แล้วเติมส่วนประกอบดังนี้ oligo dT primer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร random primer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ dNTP ที่ละลายในน้ำ DEPC ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 13 ไมโครลิตรด้วยน้ำ DEPC ผสมให้เข้ากันจากนั้นจึงนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เมื่อบ่มเสร็จแล้วจึงเติมส่วนประกอบต่างๆ จากชุดทดลอง SuperScript® III Reverse Transcriptase ดังนี้ 5X RT buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DTT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร RNase inhibitor ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ

reverse transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการหยุดปฏิกิริยาที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สาย cDNA ที่ได้จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมาย

ชื่อไพรเมอร์	ยีนเป้าหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')
MeAVP1_1-F	<i>MeAVP1_1</i>	CTAGTCGCAATGTTGTCCGGTTCT
MeAVP1_1-R		TCACTCATCAGGAGTACCCCTTC
MeAVP1_2-F	<i>MeAVP1_2</i>	TGCTCCCTTCTTTGCTACTCATGG
MeAVP1_2-R		GCGATGTAGCGGAAGCAAATCTCA
MeAVP1_3-F	<i>MeAVP1_3</i>	TGCTTATCCACACTCCTGCTTCTG
MeAVP1_3-R		CCTTGCACGTTGACTCGACCATTT
MeAVP1_5-F	<i>MeAVP1_5</i>	TGCAAATGGTGAGTCATGTCCGAG
MeAVP1_5-R		TGGCCGACAGCGTGTGAATATAGA
MeMRB1_1-F	<i>MeMRB1_1</i>	TTGGCAGCACTAAGGCTACATTGG
MeMRB1_1-R		CTGCATACCTTGTGAATCGTTGCC
MeMRB1_2-F	<i>MeMRB1_2</i>	CGGCGATCCTCCATTCAATTTGGAA
MeMRB1_2-R		TTTGCTTCGCCTGGAACAAAGGAG
MeEXO_1-F	<i>MeEXO_1</i>	GCTATGCTGGAAACCTATTGGTGG
MeEXO_1-R		CGTCTCTCTCTCTATATGTGTAGCGT
MeEXO_2-F	<i>MeEXO_2</i>	TGCCGGCAACTTACTGGTAGATTC
MeEXO_2-R		TGCAACATCCCTCTCTCTAATCTC
MeEXO_3-F	<i>MeEXO_3</i>	TTAGTGGACGCTACAACCTGGTGCT
MeEXO_3-R		CCTTGTGCTCATGCAAGCTCCAAA
MeEXO_4-F	<i>MeEXO_4</i>	TGGGATATATGGCAAGGGAGCCTA
MeEXO_4-R		TCTCTGTCTCGCAATTCTACAGCC
MeEXO_5-F	<i>MeEXO_5</i>	CTTGTCTGGGATATATGGCAAAG
MeEXO_5-R		GCTACAAACAAGTAGAGGCATATC

4.4. การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

การออกแบบไพรเมอร์จะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลุ่ม *MeAVP1*, *MeEXO* และ *MeMRB1* ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการ และการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนมาแล้ว โดยการออกแบบจะออกแบบให้ไพรเมอร์ทิศทางใดทิศทางหนึ่ง หรือทั้ง 2 ทิศทางให้อยู่ในส่วนหาง 3' UTR ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนั้น เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเฉพาะยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น จึงทำให้แน่ใจว่าผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกที่ได้เกิดจากยีนที่ต้องการเพียงยีนเดียว ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์จะใช้โปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 (<http://sg.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>) โดยรายละเอียดและข้อมูลของไพรเมอร์ได้แสดงในตารางที่ 2

4.5. Semi-quantitative RT-PCR

กรรมวิธี semi-quantitative RT-PCR จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนกลุ่ม *MeAVP1*, *MeEXO* และ *MeMRB1* โดยนำ cDNA ของตัวอย่างมันสำปะหลังแต่ละส่วนมาเป็น DNA สายต้นแบบของปฏิกิริยาเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนแต่ละกลุ่มว่ามีระดับการแสดงออกอย่างไรที่ส่วนต่างๆของมันสำปะหลัง โดยทำการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนควบคู่ไปกับยีน *18S rRNA* ที่มีการแสดงออกคงที่ในทุกอวัยวะของต้นมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นการยืนยันความถูกต้องผลของการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนกลุ่มดังกล่าวว่ามีการแสดงออกที่แตกต่างกันจริง โดยการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนแต่ละกลุ่มยีนดำเนินการศึกษา 2 ครั้ง ครั้งแรกจะเป็นการศึกษาในบางตัวอย่างของอวัยวะมันสำปะหลังเพื่อคัดเลือกสมาชิกยีนของแต่ละกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกค่อนข้างสูงในส่วนของรากสะสมอาหาร แล้วจึงนำสมาชิกยีนนั้นไปศึกษาในทุกตัวอย่างของอวัยวะมันสำปะหลังเพื่อยืนยันแบบแผนการแสดงออกของยีน

การทำ semi-quantitative RT-PCR จะต้องมีการปรับและเลือกใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ และทำการปรับจำนวนรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่ให้เหมาะสมด้วยเช่นกัน เพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยายังอยู่ในช่วง exponential phase ซึ่งใน 1 ปฏิกิริยา ลูกโซ่ จะใช้ปริมาตรสุดท้ายที่ 10 ไมโครลิตร และใช้ชุดเอนไซม์ของ TaKaRa *Ex Taq*[™] DNA Polymerase โดยใน 1 หลอด PCR จะประกอบไปด้วย 10X *Ex Taq*[™] Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 2.5 mM *Ex Taq*[™] dNTP ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร 10μM forward primer ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

10 μ M reverse primer ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 5U/ μ l *Ex Taq*TM DNA Polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ cDNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้เป็น 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (deionized water) หลังจากเตรียมปฏิกิริยาอุณหภูมิในหลอดแล้ว จึงนำไปดำเนินปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอร์ส ด้วยเครื่อง Perkin Elmer GeneAmp[®] PCR System 9700 ตามอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ระบุในตารางที่ 3 หลังจากดำเนินปฏิกิริยาเสร็จสิ้น นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอนดำเนินการกระบวนการปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอร์ส ของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนมันสำปะหลังเป้าหมาย

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ	เวลา
initial denaturation	94°C	5 นาที
denaturation	94°C	30 วินาที
annealing	T _m ของคู่ไพรเมอร์	30 วินาที
extension	72°C	1 นาที
final extension	72°C	5 นาที

4.6. อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นกรรมวิธีการแยกโมเลกุล DNA ด้วยขนาด ซึ่งสามารถจะช่วยวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอร์ส ได้ว่ามีขนาดตรงตามที่คาดหมายไว้หรือไม่ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จะต้องเตรียมเจลด้วยการผสมผงเจลอะกาโรสเข้ากับ 0.5X TBE buffer (45mM Tris-borate, 1 mM EDTA) ซึ่งในการวิเคราะห์ผลของการทำ Semi-quantitative RT-PCR ทำการเตรียมเจลอะกาโรสให้มีความเข้มข้น 1.8% โดยมวลต่อปริมาตรของ 0.5X TBE buffer เมื่อชั่งตวงเจล และ 0.5X TBE buffer เรียบร้อยแล้ว นำไปเข้าเครื่องไมโครเวฟจนกระทั่งผงเจลอะกาโรสละลายรวมเข้ากับบัฟเฟอร์จนหมด จากนั้นจึงเทเจลที่หลอมละลายแล้วลงบนถาดเตรียมเจลและเสียบหัวเจลลงไปบนถาดเตรียมเจล รอจนกระทั่งอะกาโรสเจลแข็งตัวจนพร้อมใช้งานเป็นเวลาประมาณ 30-45 นาที เมื่อเตรียมเจลพร้อมแล้วจึงทำการเตรียมตัวอย่างผลผลิตปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอร์ส ที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยผสมตัวอย่างผลผลิตปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอร์ส 10 ไมโครลิตรเข้ากับ 6X loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanal FF, 30% glycerol) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ก่อนที่จะเติมลงไปในหลุมของเจลอะกาโรสที่เตรียมไว้ โดยวางเจล

ไว้ในแท้งก์ที่มี 0.5X TBE buffer อยู่ หลังจากเติมตัวอย่างทั้งหมดจนครบแล้วเติม DNA มาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) ลงไปเพื่อเป็น DNA ขนาดมาตรฐานใช้ เปรียบเทียบขนาดกับตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นทำการเปิดเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ กำลังไฟที่ 135 V เป็นเวลาประมาณ 35 นาที เมื่อเครื่องดำเนินการจนเสร็จสิ้นแล้ว นำเจลไปย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide (EtBR) ความเข้มข้น 0.5 µg/ml เป็นเวลา 10-15 นาที ก่อนที่จะนำไป วิเคราะห์ผลเจลอายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation (GENE GENIOUS Bio Imaging system, SYNGENE)

5. การสร้างพาหะสำหรับถ่ายโอนยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* ของมันสำปะหลัง

5.1. การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

เพื่อการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนเป้าหมายกลุ่ม *MeAVP1* *MeEXO* และ *MeMRB1* ของมันสำปะหลังจะอาศัยวิธีการถ่ายโอนพาหะถ่ายโอนยีนที่เรียกว่า gene overexpression analysis เพื่อเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนในระดับสูง แล้วถ่ายโอนเข้าสู่พืชเพื่อศึกษาผลกระทบของยีนที่มี ต่อพืช ซึ่งผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายทั้ง 3 กลุ่ม จะนำมาช่วยพิจารณาคัดเลือกยีนในกลุ่มเป้าหมายที่น่าจะมีบทบาทหน้าที่ในการกระตุ้นและควบคุมกระบวนการขยายตัวของขนาดอวัยวะในพืชมันสำปะหลัง โดยยีนเป้าหมายดังกล่าวควรจะมีการแสดงออกสูงในระยะที่ พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราสูง โดยเฉพาะในรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง ทำการคัดเลือก ยีนมาเพื่อใช้สร้างพาหะถ่ายโอนยีน ซึ่งการสร้างพาหะถ่ายโอนยีนนั้นเริ่มจากการโคลนแยกยีน เป้าหมาย ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีนที่ต้องการ โดยออกแบบคู่ไพรเมอร์ให้จำเพาะ กับปลายสุดบริเวณ 5' UTR และ 3'UTR ของ cDNA โดยใช้ข้อมูลจีโนมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ สาย cDNA ที่สมบูรณ์ที่ได้จากฐานข้อมูลของมันสำปะหลัง (www.phytozome.net/cassava) ซึ่งไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณปลาย 5' UTR ของยีนเป็น forward primer จะถูกออกแบบให้มีตำแหน่งตัด จำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ส่วนของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ 3'UTR ของยีนเป็น reverse primer จะถูกออกแบบให้มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I โดยในการ ออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมดใช้โปรแกรม Oligoanalyzer 3.1 และข้อมูลไพรเมอร์สำหรับการสร้าง พาหะถ่ายโอนยีนมีดังที่แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนแยกยีนเป้าหมายเพื่อใช้ในการสร้างพาหะการถ่ายโอนยีน

ชื่อไพรเมอร์	ยีนเป้าหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์จากทิศทาง 5' ไป 3'	อุณหภูมิ Tm (°C)	ขนาดผลผลิต (คู่เบส)
MeAVP1_1-BamHI-F	<i>MeAVP1_1</i>	TCTGTGCTCTGGATCCTTAGTTTCTT	54	2,575
MeAVP1_1-SacI-R		GAAATTGGAGAGCTCTAGATTAACC	56	
MeAVP1_2-BamHI-F	<i>MeAVP1_2</i>	GAGAACTGGGATCCATTTGTGGGTTTTGG	61	2,540
MeAVP1_2- SacI -R		AACTTGGAGCTCTAGCGGAAGCAAATCTC	61	
MeEXO1-BamHI-F	<i>MeEXO1</i>	CACAGCCTATTGGATCCTCTTCTTC	57	1,061
MeEXO1- SacI -R		ATCCTACTCAACGAGCTCCAAGC	57	
MeEXO3-BamHI-F	<i>MeEXO3</i>	TCTAAACGGATCCTAAGCTCA	51	1,084
MeEXO3- SacI -R		CTCATGCGAGCTCCAAAATAAA	51	
MeMRB1-BamHI-F	<i>MeMRB1</i>	AAGTCTGAGTTGGATCCAGTTTCCA	56	1,394
MeMRB1- SacI -R		TGTAGCCTTAGAGCTCCCAAATGTA	56	

5.2. ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เมื่อได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายในกลุ่ม *MeAVP1* *MeEXO* และ *MeMRB1* นำคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบเข้าสู่ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) โดยใช้ cDNA จากส่วนของอวัยวะของมันสำปะหลังที่ยีนนั้นมีการแสดงออกสูงมาเป็นแม่แบบ ซึ่งขั้นตอนนี้ใช้ชุดเอนไซม์ Advantage[®] 2 Polymerase Mix (Clontech) ที่มีคุณสมบัติ proof-reading เพื่อป้องกันการกลายพันธุ์ของเบสในผลผลิตของปฏิกริยาลูกโซ่ โดยส่วนประกอบในแต่ละปฏิกริยาประกอบด้วย 10X Advantage[®] 2 PCR Buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร 10 μ M forward primer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10 μ M reverse primer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Advantage[®] 2 Polymerase Mix ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และ cDNA สายแม่แบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (Deionized water) ให้เป็น 25 ไมโครลิตร เมื่อทำการเตรียมส่วนผสมของปฏิกริยา PCR เสร็จเรียบร้อยแล้ว จึงนำไปดำเนินปฏิกริยาด้วยเครื่อง Bio-Rad C1000[™] Thermal Cycler ด้วยอุณหภูมิ annealing และจำนวนรอบปฏิกริยาที่เหมาะสมกับคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบ

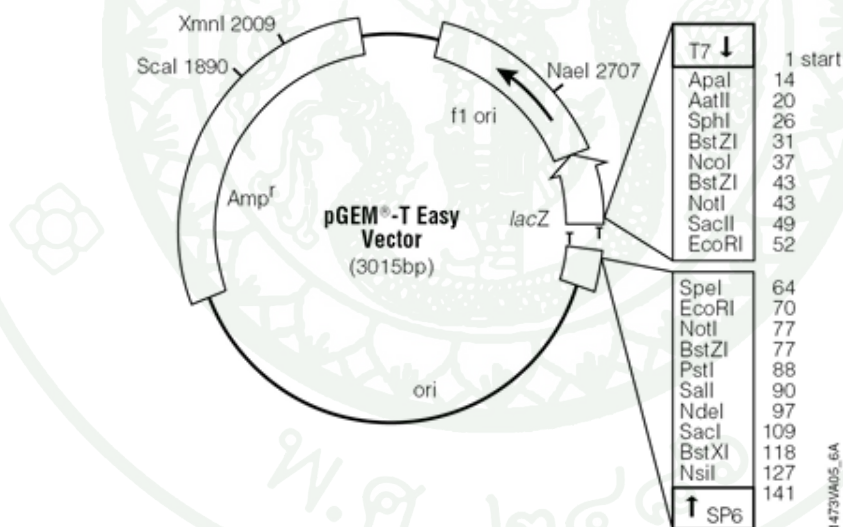
5.3. อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ในการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ในขั้นตอนนี้ทำการเตรียมเจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 1% โดยมวลต่อปริมาตรของ 0.5X TBE buffer และเปรียบเทียบผลผลิต PCR ดังกล่าวกับ DNA ขนาดมาตรฐาน GeneRuler[™] 1kb Plus DNA Ladder เพื่อเปรียบเทียบขนาดของผลผลิต PCR ว่าตรงตามขนาด PCR ที่คาดคะเนจากระยะห่างของไพรเมอร์ที่ออกแบบหรือไม่

5.4. การถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli*

5.4.1. ปฏิบัติการเชื่อมต่อพลาสมิด (Ligation)

เมื่อได้ผลผลิต PCR ที่ได้จากการแยกสมาชิกกลุ่มยีนเป้าหมาย *MeAVP1*, *MeEXO* และ *MeMRB1* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะแล้ว ในขั้นตอนต่อไปจะนำผลผลิต PCR ดังกล่าวเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector (Promega, ภาพที่ 14) เพื่อใช้ในการโคลนเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ที่ได้เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* โดยในแต่ละปฏิบัติการการเชื่อมต่อ (Ligation) ประกอบด้วย 2X Rapid Ligation Buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร pGEM[®]-T Easy vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และผลผลิต PCR 3 ไมโครลิตร เมื่อผสมส่วนประกอบของปฏิบัติการเชื่อมต่อพลาสมิดเสร็จเรียบร้อยแล้วนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ก่อนที่จะนำไปเข้าสู่กรรมวิธีการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli*



ภาพที่ 14 แสดงแผนภาพของพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector (Promega)

ที่มา: Promega (2014)

5.4.2. การถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด (Transformation)

การถ่ายโอนพลาสมิดที่เชื่อมต่อเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* จำเป็นต้องเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ให้อยู่สภาวะ competent โดยอาศัยการกระตุ้นด้วยสารเคมีก่อน เมื่อได้ *E. coli* ที่อยู่สภาวะ competent แล้ว จึงนำพลาสมิดสายผสมที่เชื่อมต่อกับผลผลิต PCR แล้วมาเติมลงในแบคทีเรียที่เตรียมไว้ข้างต้นด้วยปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 200 μ l หลังจากเติมพลาสมิด ลงไปแล้วทำการบ่มเซลล์แบคทีเรียกับพลาสมิดในน้ำแข็งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งโดยทันทีอีกเป็นเวลา 2 นาที โดยเรียกกรรมวิธีการนี้ว่า heat-shock เมื่อผ่านกระบวนการ heat-shock เรียบร้อยแล้วทำการเติมอาหารเหลว LB (Luria-Bertani, 1% Tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride, pH 7) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไปในหลอดแบคทีเรียที่ผ่านการ heat-shock แล้ว นำหลอดไปแช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อในหลอดปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาสเปรด (spread) ลงบนเพลทอาหารแข็ง LB (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride, 1.5% bactoagar, 50 μ g/ml ampicillin, pH 7) ที่เติม X-Gal ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน และนำไปตรวจสอบวิเคราะห์ต่อไป

5.4.3. การตรวจสอบโคลนีย์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (Colony PCR)

เมื่อบ่มเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้ถ่ายโอนพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector สายผสม ที่เชื่อมต่อกับผลผลิต PCR จากยีนเป้าหมายจนเกิดเป็นโคลนีย์ขึ้นบนเพลทอาหารแข็ง LB ทำการคัดเลือกโคลนีย์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจากสีของโคลนีย์ โดยคัดเลือกโคลนีย์สีขาวจำนวน 10-15 โคลนีย์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ผลการถ่ายโอนพลาสมิดว่ามียีนเป้าหมายแทรกอยู่หรือไม่ ด้วยการตรวจสอบโคลนีย์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (colony PCR) โดยใช้ไม้จิ้มฟันขนาดเล็ก เชี่ยวไปบนโคลนีย์สีขาวในเพลทอาหาร และนำไปปิ้งคลงบนเพลทอาหารใหม่เรียกเพลทนั้นว่า master plate จากนั้นนำไม้จิ้มฟันเดิมมา inoculate ลงไปในหลอด PCR ที่เตรียมไว้ ซึ่งใช้ชุดเอนไซม์ของ Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) โดยใน 1 ปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X PCR Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 50 mM MgCl₂ ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร 10 μ M forward primer ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 10 μ M reverse primer ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 10 mM dNTP ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร Platinum[®] Taq DNA Polymerase ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น

10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (deionized water) โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นคู่เดียวกันกับที่ใช้ในการแยกโคลนยีนข้างต้น จากนั้นนำไปดำเนินปฏิกิริยาถูกลูโซ่ด้วยเครื่องเครื่อง Bio-Rad C1000™ Thermal Cyclers ด้วยอุณหภูมิ annealing และจำนวนรอบปฏิกิริยาที่เหมาะสมกับคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบ และนำมาวิเคราะห์ผลด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ในส่วนของ master plate นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืนเพื่อเก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

5.4.4. การสกัดพลาสมิด DNA (Plasmid extraction)

เมื่อตรวจสอบผลการถ่ายโอนพลาสมิด pGEM®-T Easy vector จนพบโคลนที่มียีนในกลุ่มเป้าหมายแทรกอยู่ ทำการคัดเลือกโคลนที่พบยีนดังกล่าวจาก master plate ที่ทำเอาไว้ข้างต้น เพื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอด 15 มิลลิลิตร 1 คืน โดยเชื้อที่เลี้ยงนี้จะนำมาสกัดพลาสมิด DNA เพื่อนำพลาสมิดที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ผลการถ่ายโอนอย่างละเอียดอีกครั้งด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการส่งไปสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ซึ่งการสกัดพลาสมิด DNA ได้ใช้ชุดทดลองของ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) โดยใช้ขั้นตอนตามชุดทดลอง คือ ทำการเก็บเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงข้างต้นด้วยการเทเชื้อลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียตกลงที่ก้นหลอด เทส่วนใสด้านบนออก ทำซ้ำขั้นตอนนี้จนเชื้อที่เลี้ยงเอาไว้หมด จากนั้นใช้สาร PD1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยก่อนใช้ต้องทำการเติม RNase ของชุดทดลองก่อน จากนั้นนำหลอดที่เติมสาร PD1 แล้วไป vortex เพื่อให้ตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ก้นหลอดหลุดออกจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันกับ PD1 แล้วจึงเติมสาร PD2 ลงไป 200 ไมโครลิตร ทำการพลิกหลอดไปมาจนสารเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เมื่อครบเวลาตามกำหนดแล้วเติมสาร PD3 ลงไป 300 ไมโครลิตร และพลิกหลอดไปมาจนมั่นใจว่าสารได้สัมผัสกับ PD3 จนทั่ว จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการถ่ายส่วนใสด้วยการปิเปตส่วนใสด้านบนไปใสใน PD columns ของชุดทดลอง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ส่วนใสจะเคลื่อนผ่านคอลัมน์ตกลงไปในหลอดที่รองรับอยู่ด้านล่าง ส่วน DNA จะติดอยู่ที่คอลัมน์ ทำการทิ้งส่วนใสด้านล่างไป จากนั้นเติมสาร W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสด้านล่างออกไป แล้วเติมสาร wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเดิมอีกครั้ง โดย wash buffer จะต้องเติมเอทานอลลงไปก่อนใช้ เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้วนำคอลัมน์เปล่าไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าคอลัมน์แห้ง แล้วย้ายเฉพาะส่วนของคอลัมน์ไปวางบนหลอดปริมาตร

1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม elution buffer จากชุดทดลอง ลงไปตรงกลางของคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที เพื่อให้คอลัมน์ดูดซับ elution buffer ได้เต็มที่ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เมื่อสกัดพลาสมิด DNA ตามขั้นตอนข้างต้นแล้ว นำพลาสมิด DNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) และเก็บรักษาพลาสมิด DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

5.4.5. การตรวจสอบโครงสร้างพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อได้พลาสมิด DNA ของโคลนแบคทีเรียที่ตรวจสอบด้วยโคลนี PCR แล้วพบว่ามิใช่กลุ่มเป้าหมายอยู่ นำพลาสมิด DNA ดังกล่าวมายืนยันว่าพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector มีการแทรกเข้าไปของยีนเป้าหมายจริงด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme) โดยในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะใช้ชุดเอนไซม์ *EcoRI* ของ Thermo Scientific ซึ่งใน 1 ปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1X *EcoRI* buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ *EcoRI* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และใช้พลาสมิด DNA ที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำการปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ เมื่อผสมส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หรือ 1 คืน เพื่อให้เกิดการตัดของเอนไซม์ที่สมบูรณ์ จึงนำมาวิเคราะห์ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด DNA ด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

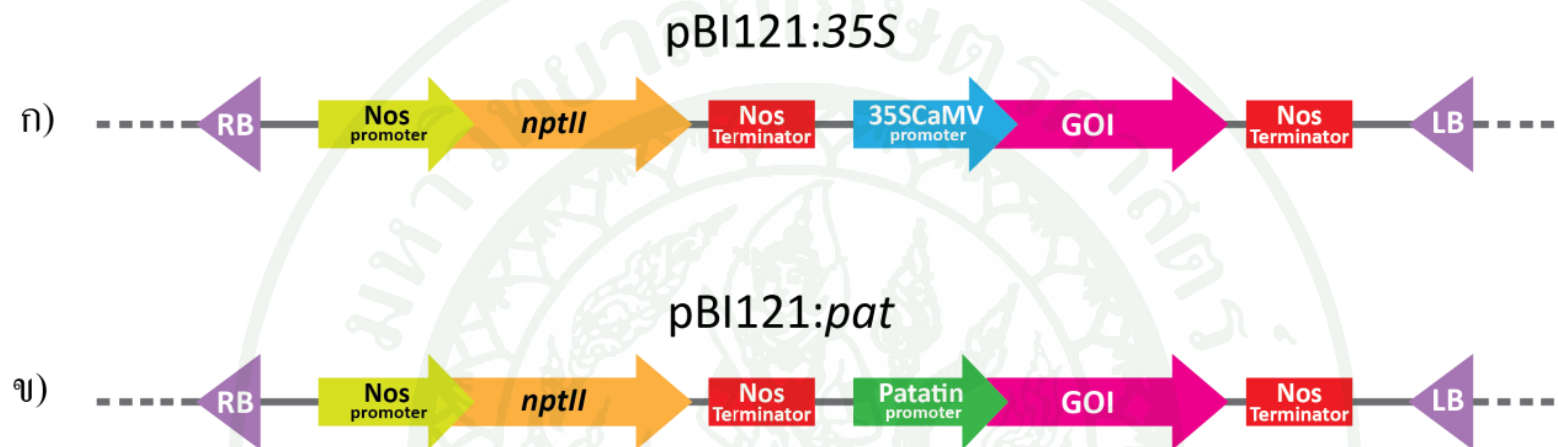
5.4.6. การสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะทำให้สามารถยืนยันได้ว่าโคลนที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector มียีนเป้าหมายแทรกอยู่จริง และเพื่อให้มั่นใจว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายที่แทรกอยู่ในพลาสมิดดังกล่าวมีความถูกต้อง จึงนำไปสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อให้แน่ใจว่าพลาสมิดสายผสมที่คัดเลือกได้มีความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation) ของยีนเป้าหมายผิดพลาดเมื่อถ่ายโอนยีนเป้าหมายเข้าสู่พืช

5.5. การถ่ายเปลี่ยนยีนเป้าหมายเข้าสู่โครงสร้างพลาสมิดถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช (pBI121)

5.5.1. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ในการถ่ายเปลี่ยนยีนเป้าหมายนี้ จะทำการย้ายยีนเป้าหมายที่อยู่ภายในพลาสมิด pGEM®-T Easy vector ที่เป็น Cloning vector เข้าสู่โครงสร้างพลาสมิดใหม่ที่จะสามารถส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมายในพืช คือโครงสร้างพลาสมิด pBI121 (ภาพที่ 15) โดยในการศึกษานี้ได้ใช้โครงสร้างพลาสมิดถ่ายยีนเข้าสู่พืช 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นโครงสร้างพลาสมิดที่ควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยโปรโมเตอร์ CaMV 35S (ภาพที่ 15ก) ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกสูง (Constitutive Promoter) ใช้ในการเพิ่มการแสดงออกของยีนเป้าหมายให้มากกว่าปกติในพืช ส่วนอีกหนึ่งชนิดจะเป็นโครงสร้างพลาสมิดที่ควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยโปรโมเตอร์ที่แสดงออกจำเพาะกับบางอวัยวะของพืช (specific tissue promoter) คือ patatin promoter (ภาพที่ 15ข) ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกสูงเฉพาะอวัยวะสะสมอาหารของพืชมันฝรั่ง ซึ่งเป็นพืชต้นแบบในการศึกษาผลของการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายในครั้งนี้ โดยการถ่ายเปลี่ยนยีนเป้าหมายจะทำการคู่กันไปสำหรับทั้งสองโครงสร้างพลาสมิด



ภาพที่ 15 แสดงแผนภาพของโครงสร้างพลาสมิด pBI121 สองชนิด คือโครงสร้างพลาสมิดที่ยีนเป้าหมาย (GOI; ลูกศรสีชมพู) อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV (ลูกศรสีฟ้า) และชนิดที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ patatin (ลูกศรสีเขียวเข้ม) โดยโครงสร้างพลาสมิดทั้ง 2 ชนิดมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ kanamycin (*nptII* ; ลูกศรสีส้ม) ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ NOS (ลูกศรสีเหลืองอ่อน) ส่วนของกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงแสดงตำแหน่งของ Nos terminator ที่ใช้หยุดกระบวนการ transcription ของยีนเป้าหมาย และยีน *nptII* และลูกศรสีม่วงแสดงขอบเขตของ left border และ right border ซึ่งเป็นขอบเขตที่บ่งบอกว่าโครงสร้างบริเวณที่อยู่ในขอบเขตนี้จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่พืช

การถ่ายเปลี่ยนยีนเป้าหมายเข้าสู่โครงสร้างพลาสมิดดังกล่าว จะนำพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนของแบคทีเรียที่ผ่านการตรวจสอบด้วยโคลนี PCR และส่วนการยืนยันผลด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ และสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วว่ามียีนเป้าหมายอยู่จริง มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อตัดแยกยีนเป้าหมายออกจากโครงสร้างพลาสมิด pGEM®-T Easy vector ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะตัดจำเพาะกับตำแหน่งตัดเอนไซม์ที่ได้ออกแบบให้มีอยู่ภายในคู่อพรเมอร์ที่ใช้โคลนแยกยีนในตอนต้น ปฏิบัติการตัดจะใช้ชุดเอนไซม์ของ Thermo scientific ซึ่งการตัดจะอาศัยการตัดแบบ double digestion คือใช้เอนไซม์ 2 เอนไซม์ตัดพลาสมิดพร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว โดยใน 1 ปฏิกริยาจะประกอบด้วย 10X *Bam*HI buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Bam*HI ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Sac*I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใช้พลาสมิดปริมาณ 1-2 ไมโครกรัมต่อการตัด 1 ปฏิกริยา ปรับปริมาตรให้เป็น 40 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ จากนั้นนำไปบ่ม 5 ชั่วโมง หรือ 1 คืนเพื่อให้เกิดการตัดที่สมบูรณ์ ในกรณีที่บางยีนมีตำแหน่งตัดเอนไซม์ *Bam*HI หรือ *Sac*I หรือมีตำแหน่งตัดทั้ง 2 เอนไซม์อยู่ภายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว จำเป็นที่จะต้องปรับความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละเอนไซม์ หรือปรับระยะเวลาในการดำเนินการปฏิกิริยาในการตัด เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการตัดแบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ซึ่งจะก่อให้เกิดโอกาสการตัดของเอนไซม์ภายในยีนลง ทำให้ได้ผลผลิตจากการตัดเป็นยีนเป้าหมายที่เต็มยีนโดยไม่มีส่วนใดของยีนถูกตัดออกไป เมื่อได้ทำการตัดพลาสมิดดังกล่าวแล้วจึงนำไปแยกผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยกรรมวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบผลของการตัดด้วยเอนไซม์ หากผลการตัดสำเร็จจะเห็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับเป้าหมาย และพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับขนาดของ pGEM®-T Easy vector ด้วย โดยในขั้นตอนนี้จะทำการตัดอะกาโรสเจลภายใต้แสง UV เพื่อตัดอะกาโรสเจลในส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอตรงกับขนาดของยีนเป้าหมาย เพื่อนำมาสกัดแยกชิ้นส่วนยีนเป้าหมายนั้นออกจากอะกาโรสเจลและนำไปเชื่อมต่อกับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ต่อไป

5.5.2. การสกัดแยกดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

การสกัดชิ้นยีนเป้าหมายออกจากอะกาโรสเจลจะใช้ชุดทดลอง QIAquick Gel Extraction (Qiagen) โดยเมื่อได้ทำการตัดเจลในบริเวณที่มีชิ้นยีนเป้าหมายมาแล้ว นำไปล้างเพื่อวัดน้ำหนักเจลโดยตามวิธีการของชุดทดลองประเมินน้ำหนักอะกาโรสเจล 100 มิลลิกรัมเป็นปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจลที่ได้ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเพื่อให้อะกาโรสเจลละลาย โดยบ่มเป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายจนหมด เมื่อบ่มจนอะกาโรสเจลละลายจนหมดแล้วเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของ

ปริมาตรเจลดอนต้นผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ของชุดทดลองและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการเติมบัฟเฟอร์ QG ลงไปในคอลัมน์อีกครั้งที่ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเดิมอีกครั้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5 นาที ก่อนนำไปปั่นที่เวลาและความเร็วรอบเดิม จากนั้นก่อนที่จะทำการชะเอาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่เกาะอยู่ที่คอลัมน์ออก นำคอลัมน์เปล่าไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีบัฟเฟอร์หลงเหลืออยู่ภายในคอลัมน์ ทำการย้ายเฉพาะส่วนของคอลัมน์ไปวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 ไมโครลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB ลงไปปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการชะดีเอ็นเอเป้าหมายออกจากคอลัมน์ โดยก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เมื่อสกัดแยกชิ้นยีนเป้าหมายออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดทดลองตามวิธีข้างต้นแล้วนำไปวิเคราะห์ผลการสกัดด้วยกรรมวิธีอะกาโรสเจลอีกครั้ง และนำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)

5.5.3. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับโครงสร้างพลาสมิด pBI121

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากอะกาโรสเจลข้างต้นมาเชื่อมต่อกับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งโครงสร้างพลาสมิดดังกล่าวได้มีการตัดส่วนของยีน *GUS* ออกไปด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I และสกัดแยกพลาสมิด pBI121 ออกด้วยกระบวนการเดียวกันกับชิ้นยีนเป้าหมายข้างต้น (5.5.2) ทำให้มีปลายที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ ในขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 จะใช้ชุดทดลองของ T4 DNA Ligase (Invitrogen) โดยใน 1 ปฏิกริยาจะคำนวณปริมาตรให้ความเข้มข้นระหว่างโครงสร้างพลาสมิด และชิ้นยีนเป้าหมายอยู่ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นเติม 5X DNA Ligase Reaction Buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร T4 DNA Ligase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

5.5.4. การถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121 สายผสม เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli*

เมื่อได้เชื่อมต่อยีนเป้าหมายเข้ากับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ทั้ง 2 ชนิดแล้ว ทำการชักนำพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* อีกครั้งเพื่อทำการเพิ่มปริมาณพลาสมิด pBI121 สายผสม ซึ่งการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* ใช้หลักการเดียวกันกับการถ่ายโอนพลาสมิด pGEM®-T Easy vector โดยเตรียมเซลล์แบคทีเรียให้อยู่ในสถานะ competent จากนั้นเติมพลาสมิดที่ทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับยีนเป้าหมายแล้วลงไป 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำ heat-shock เซลล์ จากนั้นเติมอาหารเหลว LB ลงไป นำไปเลี้ยง 1 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าหมุนวนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมา spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะกานาไมซิน (kanamycin) ลงไป ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน และนำไปตรวจสอบโคลนของแบคทีเรียที่มีโครงสร้างพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับยีนเป้าหมายด้วยการทำโคลนี PCR และนำไปสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน เมื่อได้โคลนที่มีความถูกต้องแล้วทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนดังกล่าวเพื่อใช้ในการถ่ายโอนเข้าสู่พืชเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนต่อไป

6. การถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121 สายผสม ที่บรรจุยีนเป้าหมายเข้าสู่มันฝรั่ง

6.1. การถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*

ในกระบวนการการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด overexpression เข้าสู่พืชมันฝรั่งจะใช้การถ่ายโอนโดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นตัวกลางในการถ่ายโอน ดังนั้นจึงต้องทำการชักนำให้โครงสร้างพลาสมิด overexpression เข้าสู่ *A. tumefaciens* ก่อน โดยการชักนำโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่ *A. tumefaciens* เริ่มจากการทำให้แบคทีเรียอยู่ในสถานะ competent ซึ่งขั้นแรกจะต้องทำการเพาะเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ในอาหารเหลว YEP (1% yeast extract, 1% bacto peptone, 0.5% NaCl) ที่เติมยาปฏิชีวนะ kanamycin ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่ผ่านการถ่ายโอนและคัดเลือกแล้วว่า มีโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมาย มา streak ลงบนเพลทอาหารแข็ง YEP (1% yeast extract, 1% bacto peptone, 0.5% NaCl, 1.5% Agar, kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) และทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว YEP ตามสูตรอาหารข้างต้นปริมาตร 5 มิลลิตรในหลอดปราศจากเชื้อ จากนั้นนำเชื้อไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเพาะเชื้อแบคทีเรีย เป็นเวลา 1 คืน เมื่อครบกำหนดเวลาทำการถ่ายเชื้อในหลอดอาหารปริมาตร 5

มิลลิลิตร ลงสู่ขวดลูกหมพอที่มีอาหารเหลวสูตร YEP ปริมาตร 45 มิลลิลิตร และนำไปเลี้ยงในสภาวะเดิมจนกระทั่งเชื้อแบคทีเรียเจริญจนมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงแสง 600 nm เท่ากับ 0.5 จากนั้นทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อเก็บเซลล์แล้วเทส่วนของเหลวที่เป็นอาหารทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ด้วย 0.15 M NaCl ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบและอุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอนอีกครั้งด้วย 20 mM CaCl_2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ทิปตัดปลายดูดเชื้อที่ละลายด้วย 20 mM CaCl_2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งในตอนนีเซลล์ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* อยู่ในสภาวะ competent และพร้อมที่จะนำไปสู่กระบวนการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดต่อไป

เมื่อได้เซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* แล้วทำการชักนำโครงสร้างพลาสมิด pBI121 สายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *A. tumefaciens* โดยนำโครงสร้างพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนที่ได้รับการยืนยันว่ามีอินเป้าหมายแล้ว 1 ไมโครกรัม เติมนลงไปในแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่อยู่ในสภาวะ competent บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกระตุ้นให้แบคทีเรีย *A. tumefaciens* รับโครงสร้างพลาสมิดเข้าไปในเซลล์ด้วยวิธีการ Freeze-Thaw คือนำเซลล์แบคทีเรียแช่ลงในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อให้เซลล์เกิดการแข็งตัว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เซลล์ที่แข็งตัวเกิดการละลายและรับเอาโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ เมื่อเซลล์ละลายแล้วเติมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย *A. tumefaciens* YEP ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมอาหารเหลว YEP ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการละลายตะกอนเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกับอาหารที่เติมนลงไปแล้วจึงนำไป Spread ลงบนเพลทอาหารแข็ง YEP และนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน ทำการคัดเลือกโคโลนีเพื่อตรวจสอบด้วยวิธีการทำโคโลนี PCR แล้วทำการเลือกโคลนที่ผ่านการตรวจสอบแล้วมาเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว YEP 1 คีน เพื่อนำเชื้อที่ได้ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยจะเติม 85 % glycerol ลงไปในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ได้เติมเชื้อไว้แล้ว ซึ่งคำนวณให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ glycerol ที่ 20% ผสมให้เข้ากันกับเชื้อและนำเชื้อไปแช่แข็งจับผลึกในไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ในการถ่ายโอนเข้าสู่มันฝรั่งต่อไป

6.2. การถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121 สายผสมเข้าสู่มันฝรั่งผ่านกระบวนการชักนำด้วย *Agrobacterium tumefaciens*

ในการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121 สายผสมที่บรรจุยีนมันสำปะหลังเป้าหมายเข้าสู่พืชโดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* เริ่มจากการนำเชื้อที่มีโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมาย *MeAVP1* *MeEXO* และ *MeMRB1* ที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มา streak ลงบนเพลทอาหารแข็ง YEP แล้วนำเชื้อไปปั่นที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่โตบนเพลทอาหารไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YEP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเขย่าเชื้อที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 คืน จนได้ค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ (O.D.₆₀₀) ประมาณ 1.0-1.2 จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว YEP ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/ลิตร อีก 1 คืน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเขย่าเชื้อที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อวินาที นำเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ (O.D.₆₀₀) เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณเชื้อที่ต้องใช้เพื่อให้ค่าดูดกลืนแสงสุดท้ายของเชื้ออยู่ที่ 0.6 นำเชื้อปริมาณตามที่คำนวณได้ใส่ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเชื้อที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อวินาที แล้วละลายตะกอนเชื้อที่ได้ด้วยอาหารเหลวสูตร infection media media (อาหารสูตร MS ที่ไม่มี phytohormone ที่เติม 20 กรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 200 μ M acetosyringone และ 2.5 กรัม/ลิตร phytigel, pH = 5.7) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำเชื้อที่เตรียมนี้ไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อวินาทีเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งค่าดูดกลืนแสง (O.D.₆₀₀) อยู่ที่ประมาณ 0.8-1.0 นำเชื้อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสหรือบนน้ำแข็งเพื่อเตรียมนำไปทำการบุกรุกเซลล์เนื้อเยื่อมันฝรั่งต่อไป

ในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่มันฝรั่งจะใช้ส่วนบริเวณ internode ของต้นมันฝรั่งสายพันธุ์ Spunta สายพันธุ์ Atlantic และสายพันธุ์ Bhutan ในกลุ่ม Desiree ที่ถูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ โดยทำการตัดต้นมันฝรั่งเป็นท่อนเล็กๆขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร และใช้มีดจิ้มไปบริเวณตรงกลางของท่อนมันฝรั่งที่ตัดไว้เพื่อให้เกิดบาดแผลบนท่อนนั้นทำให้เชื้อที่เตรียมเอาไว้สามารถบุกรุกเข้าพืชมันฝรั่งจากบาดแผลที่เกิดขึ้นได้ เมื่อเตรียมท่อน internode ดังกล่าวได้แล้วให้นำท่อนที่ได้ไปแช่พักไว้ในอาหาร infection media เพื่อเตรียมนำไปถูกบุกรุกด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* เพื่อถ่ายโอนยีนต่อไป ทั้งนี้การเตรียมชิ้นส่วน internode จะเตรียม ประมาณ 30 ชิ้นต่อ 1 พาหะที่ทำการถ่ายโอนยีน

เมื่อทำการเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* และชิ้นส่วนของมันฝรั่งที่จะใช้ในการถ่ายโอนยีนเรียบร้อยแล้ว นำเชื้อและชิ้นส่วนของมันฝรั่งเข้าสู่กระบวนการถ่ายโอนยีน โดยนำส่วนของ internode ของมันฝรั่งบ่มในเชื้อ *A. tumefaciens* ที่เตรียมไว้ ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อไปวางในอาหารแข็งสูตร co-cultivation media (อาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส 16 กรัมต่อลิตร 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA และ 200 μ M acetosyringone) โดยนำไปบ่มในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการบุกรุกของ *A. tumefaciens* เข้าสู่เนื้อเยื่อมันฝรั่ง จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อไปเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตร callus induction media (อาหารพื้นฐานสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 16 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA) ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime (250 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ kanamycin (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อสำหรับใช้กำจัดเชื้อ *Agrobacterium* และคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพาหะที่บรรจุยีนรหัสเป้าหมายตามลำดับ โดยทำการเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 14 วัน เมื่อเนื้อเยื่อมันฝรั่งเกิดการสร้างแคลลัสขึ้นมาแล้วย้ายก้อนแคลลัสดังกล่าวไปสู่อาหารใหม่ซึ่งเป็นอาหารสูตร shoot induction media (อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 16 กรัมต่อลิตร NAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร GA3 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำการเลี้ยงในอาหารสูตรนี้เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์เพื่อให้เกิดการชักนำยอดของต้นมันฝรั่งจากแคลลัสที่ย้ายลงไป เมื่อยอดของต้นมันฝรั่งเจริญจนมีความแข็งแรงแล้วย้ายส่วนของยอดลงสู่ขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime (250 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อให้ยอดที่เกิดขึ้นนี้มีการเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งต้นที่เจริญเต็มที่แล้วจะเป็น putative transgenic ที่จะรอการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายในขั้นตอนต่อไป

6.3. การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายในต้น putative transgenic ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ จำเป็นต้องสกัด genomic DNA จากต้น putative transgenic ซึ่งการสกัดจะทำการเก็บส่วนใบจากต้น putative transgenic ที่ต้องการตรวจสอบโดยนำมาสกัด genomic DNA ด้วย 2% CTAB buffer เริ่มจากการบดตัวอย่างใบจากต้น putative transgenic ด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผง จากนั้นทำการเติมสารละลาย 2% CTAB buffer 600 ไมโครลิตร ลงไปในตัวอย่างใบที่บดละเอียดแล้ว ผสมสารละลาย 2% CTAB buffer กับตัวอย่างที่บดไว้ให้เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากผสมเข้ากันดีแล้วให้นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เมื่อ

ครบกำหนดเวลานำตัวอย่างมาพักให้เย็นลงในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที ก่อนที่จะเติม chloroform:isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ลงไปในตัวอย่างที่เย็นแล้วปริมาตร 600 ไมโครลิตร ทำการเขย่าแรงๆเพื่อให้สาร chloroform:isoamyl alcohol สัมผัสทั่วทั้งหมดยกตัวอย่าง จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทำการถ่ายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงสู่หลอดสะอาดหลอดใหม่ ทำการเติม isopropanol เพื่อตกตะกอน DNA ปริมาณ 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดไปมาจนสารผสมเข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เท isopropanol ออกโดยระวังไม่ให้ตะกอนของ DNA หลุดออก จากนั้นทำการล้างตะกอน DNA ด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้ตะกอน DNA สัมผัสกับ 70 % ethanol ทั้งหมด นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เท 70 % ethanol ออกให้หมด ทิ้งตะกอน DNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการละลายตะกอน ด้วย 10 mM Tris-HCl ที่เติมเอนไซม์ RNaseI ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสหรือ -20 องศาเซลเซียส เพื่อบริการยืนยันการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิดเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซฟอลิเมอเรสต่อไป

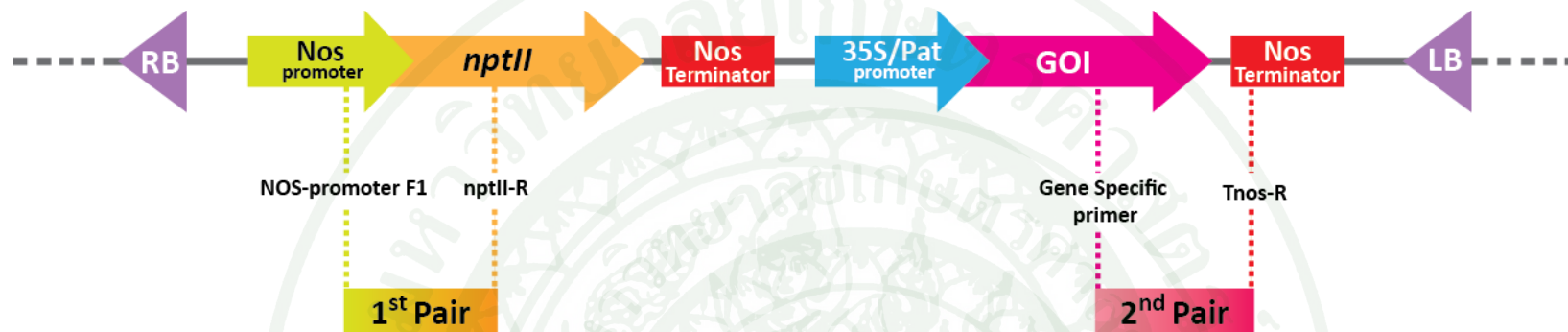
ทำการออกแบบไพรเมอร์คู่ที่หนึ่งให้จำเพาะบริเวณ NOS promoter ของยีน *nptII* โดย Forward primer อยู่ในส่วนของ NOS promoter และ reverse primer อยู่ในส่วนของยีน *nptII* ส่วนอีกคู่ไพรเมอร์ทำการออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณของยีนเป้าหมายโดยตำแหน่ง Forward primer อยู่ในยีนเป้าหมาย และ reverse primer อยู่ในส่วนของ Nos terminator (ตารางที่ 5 และภาพที่ 13) โดยใช้ทั้งสองคู่ไพรเมอร์ในการยืนยันว่าโครงสร้างพลาสมิดได้ถูกส่งถ่ายเข้าไปในต้นมันฝรั่งทั้งหมด โดยตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซฟอลิเมอเรส กับดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดออกมาจากใบของต้น putative transgenic เป้าหมาย โดยผลของปฏิกิริยาถูกลูโซของทั้ง 2 คู่ไพรเมอร์ต้องมีผลเป็นบวกเหมือนกันถึงจะสามารถยืนยันได้ว่าต้น putative transgenic เป็น transgenic โดยการเปรียบเทียบผลจะเทียบกับ positive control ซึ่งเป็นผลของปฏิกิริยาถูกลูโซจากการใช้พลาสมิด ดีเอ็นเอของโครงสร้างพลาสมิดเดียวกันที่สกัดได้จาก *Agrobacterium* มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยผลปฏิกิริยาถูกลูโซที่ได้ต้องมีขนาดเท่ากับผลปฏิกิริยาถูกลูโซของ transgenic line นอกจากนี้ต้องเทียบเคียงผลควบคู่ไปกับ negative control และ ผลปฏิกิริยาถูกลูโซจากดีเอ็นเอของมันฝรั่งที่ไม่ได้ถูกถ่ายโอนยีน (wild-type) เพื่อยืนยันว่าผลที่ได้ไม่ได้เกิดมาจากกระบวนการเตรียมปฏิกิริยาถูกลูโซที่ผิดพลาด และไม่มีโครงสร้างพลาสมิดปะปนอยู่ในมันฝรั่งที่ไม่ได้ถูกถ่ายโอนยีน

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายที่อยู่ในต้นมันฝรั่ง putative transgenic

เป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์จากทิศทาง 5' → 3'	อุณหภูมิ Tm (°C)
1st primer pair			
	NOS-promoter F1	GTCGCCTAAGGTCAGTATCAGCTAGCA	67
	notII-R	GAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCC	66
Gene specific primer (2nd primer pair)			
<i>MeAVP_1</i>	MeAVP1-1-F1	GTTTGCTCCATTCTTTGCTACACATGG	60
	MeAVP1-2-F1	GGACACTTCTGGTCCTTCACTTAATATCC	65
<i>MeAVP_2</i>	MeAVP-2-F2	ATATCCTGATCAAGCTAATGGCAGTGG	59
	MeAVP-2-F3	CAGATCCTCACAAAGCTGCTGTTATTGG	59
<i>MeEXO 1</i>	MeEXO1-F1	ACCAACCCATTTGGAAATGGATACTTC	63

ตารางที่ 5 (ต่อ)

เป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์จากทิศทาง 5' → 3'	อุณหภูมิ T _m (°C)
<i>MeEXO 3</i>	MeEXO3-F1	GGAGCTATTAGTGGACGCTACAACTGG	65
	MeEXO3-F2	GAACTGCAACAAATCCATTCGGAAATGG	59
<i>MeMRB1</i>	MeMRB1-F1	CCTTAGTGACATATCTGGAAAACAATAGG	60
	MeMRB1-F2	CATACAATCTCATTCCAGAGGAGACAGGC	60
	tnos-R-B1	AGTAACATAGATGACACCGCGC	60



ภาพที่ 16 แสดงแผนภูมิตำแหน่งของไพรเมอร์คู่ที่หนึ่ง (1st pair) และคู่ที่สอง (2nd pair) ที่ใช้ในกระบวนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายในต้น putative transgenic บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนของยีนเป้าหมาย (GOI; ลูกศรสีชมพู) โปรโมเตอร์ 35S CaMV หรือ patatin (ลูกศรสีฟ้า) ยีน *nptII* (ลูกศรสีส้ม) โปรโมเตอร์ NOS (ลูกศรสีเขียว) Nos terminator (กรอบสี่เหลี่ยมสีแดง) และส่วนของ left border และ right border (ลูกศรสีม่วง)

6.4. การตรวจสอบจำนวนซ้ำของยีนเป้าหมายด้วยกรรมวิธี Southern blot

เนื่องจากการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่พืชผ่าน *A. tumefaciens* มีโอกาสที่จะเกิดการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดหลายซ้ำเข้าไปในพืช (De Buck *et al.*, 2009) ทำให้เกิดการแทรกของยีนเป้าหมายเข้าสู่พืชหลายซ้ำ (copy) ดังนั้นเมื่อสามารถยืนยันการมีอยู่ของยีนเป้าหมายในต้น putative transgenic ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเรียบร้อยแล้ว จึงนำต้น transgenic ดังกล่าวมาตรวจสอบวิเคราะห์จำนวนชุดของยีนเป้าหมายที่อยู่ภายในต้น transgenic ด้วยวิธี Southern blot ซึ่งเป็นวิธีการติดตามยีนเป้าหมายโดยอาศัยการติดตามของฉลาก (probe) ที่สร้างให้จำเพาะกับยีนเป้าหมาย

ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยกรรมวิธี Southern blot เริ่มจากการสกัด genomic DNA จากต้น transgenic ที่ได้ทำการยืนยันด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่แล้วว่าได้รับยีนเป้าหมายเข้าไป จากนั้นนำ genomic DNA ไปผ่านกระบวนการตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* โดยใน 1 ปฏิกิริยาจะใช้ปริมาณ genomic DNA ที่ 10 µg ต่อเอนไซม์ *HindIII* 100 Unit และปรับปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาการตัดให้เป็น 200 µl นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งคืน (24 ชั่วโมง) ทำการหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที นำตัวอย่างมาโหลดลงบนเจลขนาดใหญ โดยดำเนินการกระบวนการเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเจลเข้าสู่กระบวนการถ่ายโอนตัวอย่างจากเจลไปสู่เมมเบรน (membrane) โดยก่อนที่จะทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอจากเจล จะนำเจลไปผ่านปฏิกิริยา depurination ด้วยการแช่เจลลงในสารละลาย 250 mM HCl ทำการเขย่าหมุนวนเบาๆเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเข้าสู่ขั้นตอน denaturation ด้วยการย้ายเจลมาแช่ในสารละลาย denaturation solution (0.5 M NaOH, 1.5M NaCl) เขย่าที่ความเร็วรอบ 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง แล้วปรับสภาพเจลให้เป็นกลางด้วยสารละลาย neutralization solution (0.5 M Tris-HCl, pH7.5, 1.5 M NaCl) จากนั้นนำมาเข้าสู่ขั้นตอนการถ่ายโอนดีเอ็นเอจากเจลสู่เมมเบรน โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของสารละลาย 20X SSC (3 M NaCl, 300 mM sodium citrate, pH 7.0) ที่จะนำพาดีเอ็นเอจากเจลไปสู่เมมเบรน ทำการตัดเจลและเมมเบรนให้มีขนาดเท่าๆกัน ทำการให้เตรียมอุปกรณ์เพื่อใช้ในการโอนถ่ายดีเอ็นเอจากเจลสู่เมมเบรน โดยเริ่มจากการวางเจลลงบนแท่นที่มีกระดาษกรองขนาดใหญ่ที่เปียก และปลายทั้ง 2 ด้านจุ่มลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์ 20X SSC จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่เตรียมไว้วางลงไปบนเจลและกระดาษกรอง วางทับซ้อนกันลงบนเมมเบรนให้กระดาษกรองดังกล่าวมีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร และนำกระดาษที่ ضخความหนาประมาณ 5 เซนติเมตร วางทับลงไปบนกระดาษกรอง

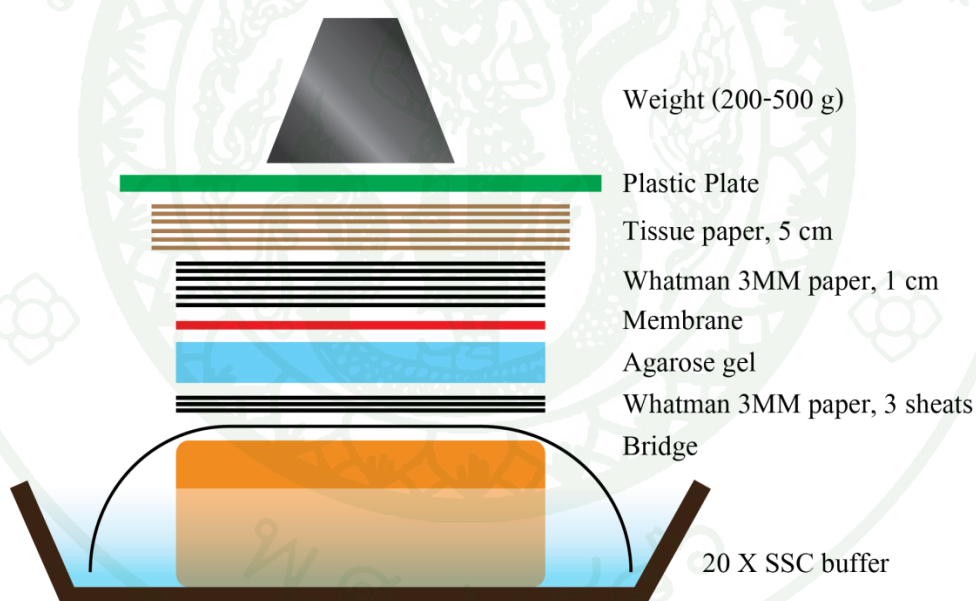
อีกชั้นหนึ่ง แล้วนำวัตถุที่มีน้ำหนักประมาณ 200-500 กรัม วางทับลงไปบนชั้นบนสุดโดยนำภาชนะพลาสติกมาทับระหว่างวัตถุกับชั้นของกระดาษทิชชู ดังแสดงในภาพที่ 17 แล้วปล่อยให้เกิดการถ่ายโอนดีเอ็นเอสู่เมมเบรนเป็นเวลาประมาณ 1 คืน เมื่อผ่านกระบวนการถ่ายโอนดีเอ็นเอสู่เมมเบรนเรียบร้อยแล้ว นำเมมเบรนไปผ่านกระบวนการ crosslink ด้วยแสง UV ด้วยเครื่อง GS GENE LINKER™ UV CHAMBER (BIORAD) เพื่อให้ดีเอ็นเอยึดติดแน่นกับเมมเบรน โดยใช้พลังงานจากเครื่อง 120 mJoules เป็นเวลา 5 นาที เมื่อเตรียมเมมเบรนพร้อมแล้วจึงนำดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลาก (Probe) มาจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายบนเมมเบรนในขั้นตอน hybridization

ก่อนเริ่มกระบวนการ hybridization ต้องทำการติดฉลากที่ดีเอ็นเอหรือสร้าง probe ก่อน ในการศึกษานี้ได้เลือกใช้ฉลากแบบไม่มีสารก่อกัมมันตภาพรังสีคือ Digoxigenin (DIG) โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ในการสร้าง probe เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ให้จำเพาะกับเป้าหมายบนโครงสร้างพลาสมิดของยีนที่ได้ทำการถ่ายโอนไปในพืช ในที่นี้เลือกออกแบบให้จำเพาะกับยีนต้านยาปฏิชีวนะ kanamycin คือยีน *nptII* ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบคือ ไพรเมอร์ *nptII*-PF: 5'- ACA-GAC-AAT-CGGG-CTG-CTC-TGA-T -3' และ ไพรเมอร์ *nptII*-RF: 5'- TAG-CCA-ACG-CTA-TGT-CCT-GAT-AGC- 3' นำไพรเมอร์มาเข้าสู่กระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยผสมส่วนประกอบปฏิกิริยาตามวิธีการของชุด PCR DIG Probe Synthesis (Roche) ตามตารางที่ 6 เมื่อได้ผลผลิตที่ถูกติดฉลากลงไปเรียบร้อยแล้ว นำ probe ที่ได้เข้าสู่กระบวนการ Hybridization โดยเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับการทำ hybridization จาก DIG Easy Hyb Granules (Roche) ผสมกับ probe ที่ผ่านการต้มเป็นเวลา 5 นาที นำบัฟเฟอร์ที่ได้ใส่ไปในหลอดแก้วสำหรับทำ hybridization ที่มีแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการ crosslink แล้วอยู่ภายในทำการบ่มในตู้ Hybridization (Techne® hybridization oven Hybrigen) เป็นเวลา 6-16 ชั่วโมง แล้วนำเมมเบรนมาล้าง probe ส่วนเกินออกโดยนำเมมเบรนที่อยู่ภายในหลอด hybridization ไปบ่มกับบัฟเฟอร์ low stringency (2X SSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 5 นาที 2 ครั้ง จากนั้นนำไปบ่มอีกครั้งด้วยบัฟเฟอร์ High stringency (0.1X SSC, 0.1% SDS) เพื่อกำจัด probe ที่ hybridize กับดีเอ็นเอที่มีความคล้ายกับเป้าหมายออกไป โดยเทบัฟเฟอร์ high stringency ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน ลงไปในหลอด hybridization แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง เป็นเวลา 15 และ 30 นาที ตามลำดับ

เมื่อเมมเบรนได้ผ่านกระบวนการ hybridization กับ probe แล้ว จะทำการติดตามฉลาก หรือ probe โดยอาศัยการจับกันของ Digoxigenin (DIG) ที่อยู่บน probe กับ anti-DIG ที่ต่อกับ เอนไซม์ alkaline phosphatase (Anti-DIG-AP) ที่สามารถย่อยสาร CPSP ให้กำเนิดเป็นแสงตกกระทบบนแผ่นฟิล์มทำให้สามารถติดตามฉลากได้ โดยกระบวนการ detection เริ่มจากการล้าง และ ป้องกันการติดตามฉลากที่ผิดพลาดบนเมมเบรน ด้วยการแช่เมมเบรนในสาร washing solution (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) และ blocking solution เป็นเวลา 2 และ 30 นาทีตามลำดับ จากนั้นนำเมมเบรนไปบ่มกับสารละลาย Antibody Solution ที่มี anti-DIG-AP ในหลอด hybridization ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการล้างด้วย Washing solution อีกครั้ง ก่อนที่จะนำมาแช่ลงใน detection solution (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเตรียมพร้อมการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น CPSP กับเอนไซม์ alkaline phosphatase ทำการเติมสารละลายสารตั้งต้น CPSP ลงไปจนท่วมเมมเบรน ทำการปิดผนึกแผ่น เมมเบรนที่อยู่ภายในสารละลายสารตั้งต้นด้วยแผ่นพลาสติกใส บ่มเมมเบรนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำแผ่นฟิล์มมาประกบลงด้านบนของแผ่นเมมเบรนทิ้งเอาไว้ในห้องมืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ 1 คืน เพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างแสงที่เกิดขึ้นกับแผ่นฟิล์มที่ ประกบลงไป หลังจากครบกำหนดเวลานำแผ่นฟิล์มแช่ลงในสาร developer เพื่อให้เกิดการทำ ปฏิกิริยาเกิดเป็นรอยดำบนฟิล์มในบริเวณที่เกิดการตกกระทบของแสง และแช่ลงในสาร fixation เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นล้างฟิล์มด้วยน้ำเปล่า และทำการตรวจสอบจำนวนชุดของยีนบนแผ่นฟิล์ม

ตารางที่ 6 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาสร้าง Probe ตามวิธีการของ PCR DIG Probe Synthesis (Roche)

สาร	ปริมาตร (μl)
10X PCR buffer	5
10X PCR DIG MIX	5
nptII-PF primer	2.5
nptII-RF primer	2.5
Enzyme mix	0.75
ดีเอ็นเอแม่แบบ	3
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรให้เป็น 50 μl



ภาพที่ 17 แสดงการเตรียมอุปกรณ์สำหรับถ่ายโอนดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรสสู่แผ่นเมมเบรนในการวิเคราะห์จำนวนชุดของยีนด้วยกรรมวิธี Southern blot

6.5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้น transgenic

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้น transgenic เป็นการวิเคราะห์ผลของการถ่ายโอนยีนว่าเมื่อผ่านกระบวนการถ่ายโอนยีน และยีนสามารถเข้าไปแทรกอยู่ภายในจีโนมของพืชได้แล้ว ยีนเป้าหมายสามารถที่จะแสดงออกได้หรือไม่ โดยการวัดการแสดงออกของยีนจะอาศัยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR เช่นเดียวกับการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนในการศึกษาขั้นต้น โดยจะทำการสกัด RNA จากต้น transgenic ที่ผ่านการยืนยันการมีอยู่ของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ และตรวจสอบจำนวนชุดของยีนในจีโนมของต้น transgenic เรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำ RNA ที่ได้ไปสร้างสาย cDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ผันกลับ หรือ reverse transcription นำ cDNA ที่ได้ไปตรวจสอบระดับการแสดงโดยใช้ไพรเมอร์ คู่เดียวกันกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่ใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในต้น transgenic (ตารางที่ 5) โดยจะศึกษาวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนเทียบกับยีน *18S rRNA* ที่มีการแสดงออกคงที่ในเนื้อเยื่อต่างๆของพืช

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การสืบหายีนสมาชิกในกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* จากฐานข้อมูลจีโนมของมันสำปะหลัง

จากการศึกษาหาข้อมูลในเบื้องต้นพบว่ามันสำปะหลังเป็นพืชที่มีรากสะสมอาหารใหญ่ ที่มีการพัฒนาการรากเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของรากให้มีขนาดใหญ่โป่งพองขึ้นจากรากฝอย ซึ่งการเพิ่มขนาดของรากเกิดจากการกระบวนการแบ่งเพิ่มปริมาณของเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น ในกระบวนการดังกล่าวจะสามารถถูกควบคุมได้ด้วยยีนบางกลุ่ม ซึ่งมีความสามารถที่จะควบคุมการขยายขนาดของอวัยวะพืชผ่านการควบคุมกระบวนการแบ่งเซลล์และขยายขนาดของเซลล์ จากการศึกษาข้อมูลในส่วนของยีนกลุ่มดังกล่าวจึงคัดเลือกยีนที่ได้มีผู้ศึกษาแล้วว่าสามารถควบคุมการเพิ่มขนาดของอวัยวะพืชได้ คือกลุ่มยีน *AVP1 EXO* และ *MRB1* ทั้งนี้ในการสืบหายีนกลุ่มเป้าหมาย *AVP1 EXO* และ *MRB1* จากฐานข้อมูลจีโนมของมันสำปะหลัง นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *AtAVP1* *AtEXO* และ *AtMRB1* จากพืชแม่แบบ *Arabidopsis* ไปเข้าสู่กระบวนการ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจีโนมของมันสำปะหลัง (www.phytozome.net/cassava) จากการตรวจสอบสามารถพบยีนในกลุ่ม *AVP1* จำนวน 7 ยีน ยีนในกลุ่ม *EXO* จำนวน 9 ยีน และยีนในกลุ่มยีน *MRB1* จำนวน 6 ยีน (ตารางที่ 7) ซึ่งเมื่อสามารถสืบหายีนกลุ่มเป้าหมายในพืชมันสำปะหลังได้ตามข้างต้นแล้ว ทำการนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนจากแต่ละสมาชิกของแต่ละกลุ่มยีนมาเปรียบเทียบกัน และทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันของสมาชิกยีนแต่ละกลุ่มยีนกับยีนแม่แบบจากต้นพืช *Arabidopsis* ที่มีรายงานการศึกษายบทบาทในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของอวัยวะ เพื่อใช้ในการคัดเลือกสมาชิกยีนที่มีความน่าจะเป็นในความใกล้เคียงกันทางด้านหน้าที่เช่นกัน

ตารางที่ 7 แสดงสมาชิกยีนกลุ่ม *AVP1* *EXO* และ *MRB1* ที่สืบพบในฐานข้อมูลจีโนมของ
มันสำปะหลัง

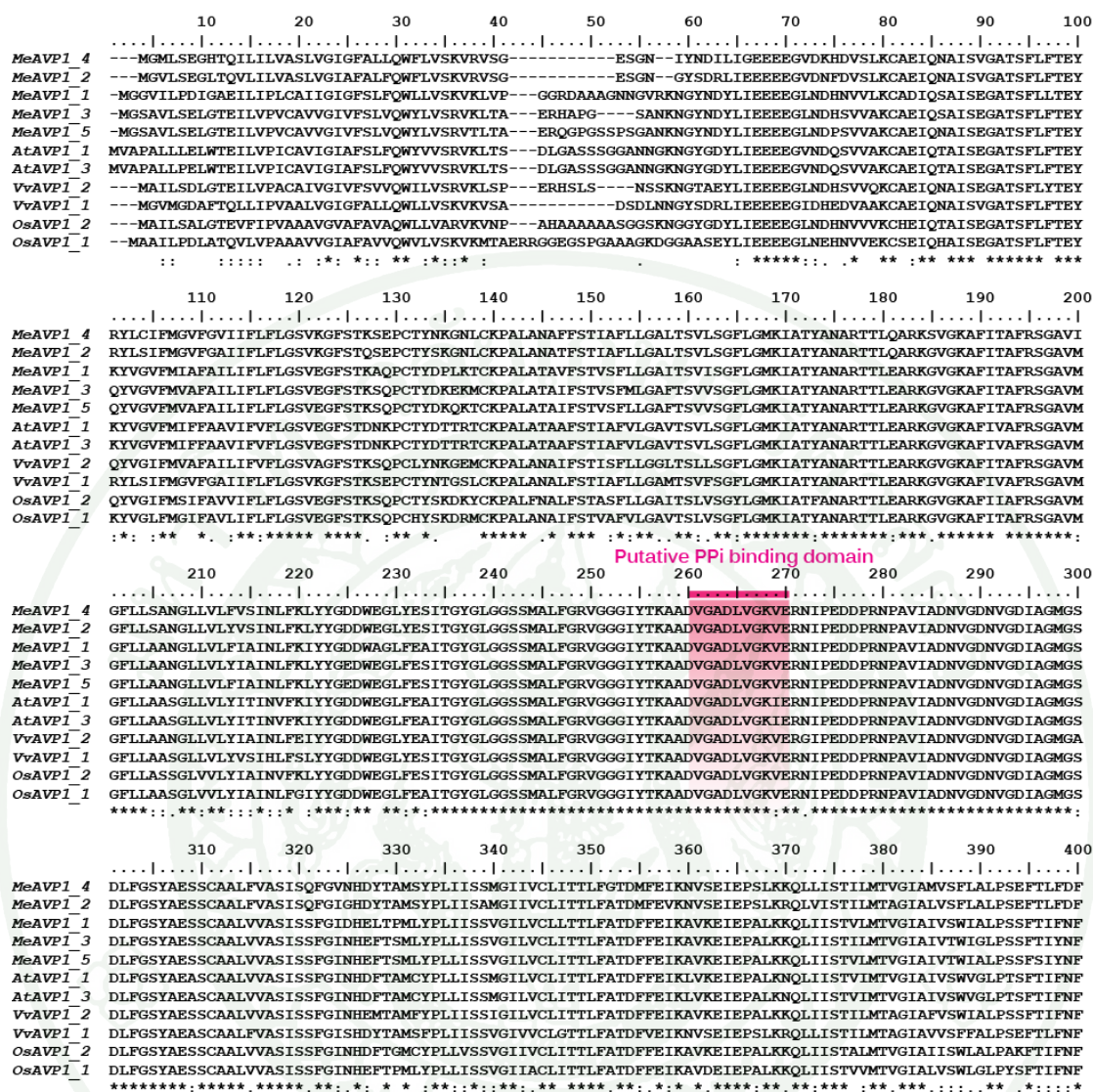
ยีนแม่แบบจาก <i>Arabidopsis</i>	รหัสของยีนที่สืบพบในฐานข้อมูล จีโนมมันสำปะหลัง	ชื่อใหม่
<i>AtAVP1</i>	cassava4.1_002124m.g	<i>MeAVP1_1</i>
	cassava4.1_002160m.g	<i>MeAVP1_2</i>
	cassava4.1_002128m.g	<i>MeAVP1_3</i>
	cassava4.1_002230m.g	<i>MeAVP1_4</i>
	cassava4.1_025325m.g	<i>MeAVP1_5</i>
	cassava4.1_001894m.g	<i>MeAVP2_1</i>
	cassava4.1_001902m.g	<i>MeAVP2_2</i>
<i>AtEXO</i>	cassava4.1_027129m.g	
	cassava4.1_012095m.g	<i>MeEXO2</i>
	cassava4.1_011938m.g	<i>MeEXO3</i>
	cassava4.1_012011m.g	<i>MeEXO5</i>
	cassava4.1_012010m.g	<i>MeEXO4</i>
	cassava4.1_029715m.g	
	cassava4.1_012973m.g	
	cassava4.1_012975m.g	
	cassava4.1_012048m.g	<i>MeEXO1</i>
<i>AtMRB1</i>	cassava4.1_008956m.g	<i>MeMRB1_2</i>
	cassava4.1_007974m.g	<i>MeMRB1_1</i>
	cassava4.1_007521m.g	
	cassava4.1_031728m.g	
	cassava4.1_008113m.g	

2. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน และการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการ

2.1. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน และการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของยีนกลุ่ม *AVP1*

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน (ภาพที่ 18) และการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของยีนกลุ่ม *AVP1* ในมันสำปะหลังทั้ง 7 ยีน ทำให้สามารถจำแนกยีน *AVP1* ในมันสำปะหลังออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่อยู่กลุ่มเดียวกันกับยีนแม่แบบจาก *AVP1* ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีน H^+ -pyrophosphatases (H^+ -PPases) Type I โดยมียีนจากมันสำปะหลังที่อยู่ในกลุ่มนี้จำนวน 5 ยีน คือ ยีน *MeAVP1_1* *MeAVP1_2* *MeAVP1_3* *MeAVP1_4* และ *MeAVP1_5* ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มของ H^+ -PPases Type II ซึ่งประกอบด้วยยีนจากมันสำปะหลัง 2 ยีน คือ ยีน *MeAVP2_1* และ *MeAVP2_2* (ภาพที่ 19)

เนื่องจากยีน *AVP1* แสดงออกให้โปรตีน H^+ -PPases Type I ที่มีโครงสร้างลักษณะเป็น transmembrane protein ที่มีการแทรกตัวในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือ เยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ ภายในเซลล์ ฉะนั้นเพื่อที่จะยืนยันโครงสร้างของโปรตีนของยีนจากมันสำปะหลังว่ายังคงโครงสร้างลักษณะเป็น transmembrane protein หรือไม่ จึงทำการศึกษาโครงสร้าง transmembrane protein จากโปรแกรม TMHMM ที่ช่วยคาดคะเนโครงสร้างโปรตีนที่น่าจะเป็น transmembrane domain ของยีนมันสำปะหลังในกลุ่มโปรตีน H^+ -PPases Type I ดังแสดงใน ภาพที่ 20 เมื่อได้โครงสร้าง transmembrane protein แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับโปรตีนจากยีน *AVP1* ของพืชแม่แบบ *Arabidopsis* พบว่าการแทรกของ transmembrane protein ของยีนในมันสำปะหลังค่อนข้างคล้ายคลึงกับพืชแม่แบบ *Arabidopsis* แต่ที่ต่างจากพืชอื่นอย่างเห็นได้ชัดคือโดเมนโปรตีนสุดท้ายที่เป็น transmembrane protein ซึ่งพบในพืชแม่แบบและพืชอื่นๆซึ่งมีการอนุรักษ์ไว้ แต่โดเมนสุดท้ายได้ขาดหายไปในยีนสมาชิกของมันสำปะหลังทั้ง 5 ยีน (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 18 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนกลุ่ม AVP1 ในมันสำปะหลัง ประกอบด้วยโปรตีน MeAVP1_1 MeAVP1_2 MeAVP1_3 MeAVP1_4 และ MeAVP1_5 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AtAVP1 จากพืชแม่แบบ *Arabidopsis* และโปรตีน AVP1 ในสิ่งมีชีวิตอื่น (Os = *Oryza sativa* และ Vv = *Vitis vinifera*) โดยบริเวณอนุรักษ์ที่คาดว่าเป็นตำแหน่ง putative PPI binding domain ถูกเน้นด้วยสีชมพู และตำแหน่ง putative H^+ translocation domain ถูกเน้นด้วยสีม่วง

Putative H⁺ translocation domain

Sequence alignment of MeAVP1 and AtAVP1 proteins. The alignment is presented in two blocks, one for residues 410-500 and another for 510-600. Conserved regions are highlighted with asterisks (*). A red box highlights a specific region in the first block. The second block shows a large gap in the AtAVP1 sequence between residues 510 and 520.

Residue positions: 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

MeAVP1_4 GTDKLVKNQWLFPCVIGLWAGLVIGFTYEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIAIVSFSSMAAMYGIAMAALGMLSTI
MeAVP1_2 GTDKLVKNWHLFFCVAIGLWAGLVIGFTYEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIAIVSFSSMAAMYGIAMAALGMLSTI
MeAVP1_1 GTQKVVKNWQFLPCLVAVGLWAGLIIGFVTEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIVSFSSMAAMYGIAVAALGMLSTI
MeAVP1_3 GTQKVVKNWQFLPCLVAVGLWAGLIIGFVTEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIAIVSFSSMAAMYGIAVAALGMLSTI
MeAVP1_5 GTQKVVKNWQFLPCLVAVGLWAGLIIGFVTEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIAIVSFSSMAAMYGIAVAALGMLSTI
AtAVP1_1 GTQKVVKNWQFLPCLVAVGLWAGLIIGFVTEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIAIVSFSSMAAMYGIAVAALGMLSTI
AtAVP1_3 GTQKVVKNWQFLPCLVAVGLWAGLIIGFVTEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIAIVSFSSMAAMYGIAVAALGMLSTI
VvAVP1_2 GSQKVVKNWQFLPCLVAVGLWAGLIIGFVTEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIAIVSFSSMAAMYGIAVAALGMLSTI
VvAVP1_1 GSTKVVKNWHLFFCVAIGLWAGLVIGFTYEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIAIVSFSSMAAMYGIAVAALGMLSTI
OsAVP1_2 GAQKEVTNWGLFFCVAIGLWAGLIIGFVTEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIAIVSFSSMAAMYGIAVAALGMLSTI
OsAVP1_1 GAQKTYNVNWQFLPCLVAVGLWAGLIIGFVTEYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYSKVIIPFPAIAIAIVSFSSMAAMYGIAVAALGMLSTI

* * * * *

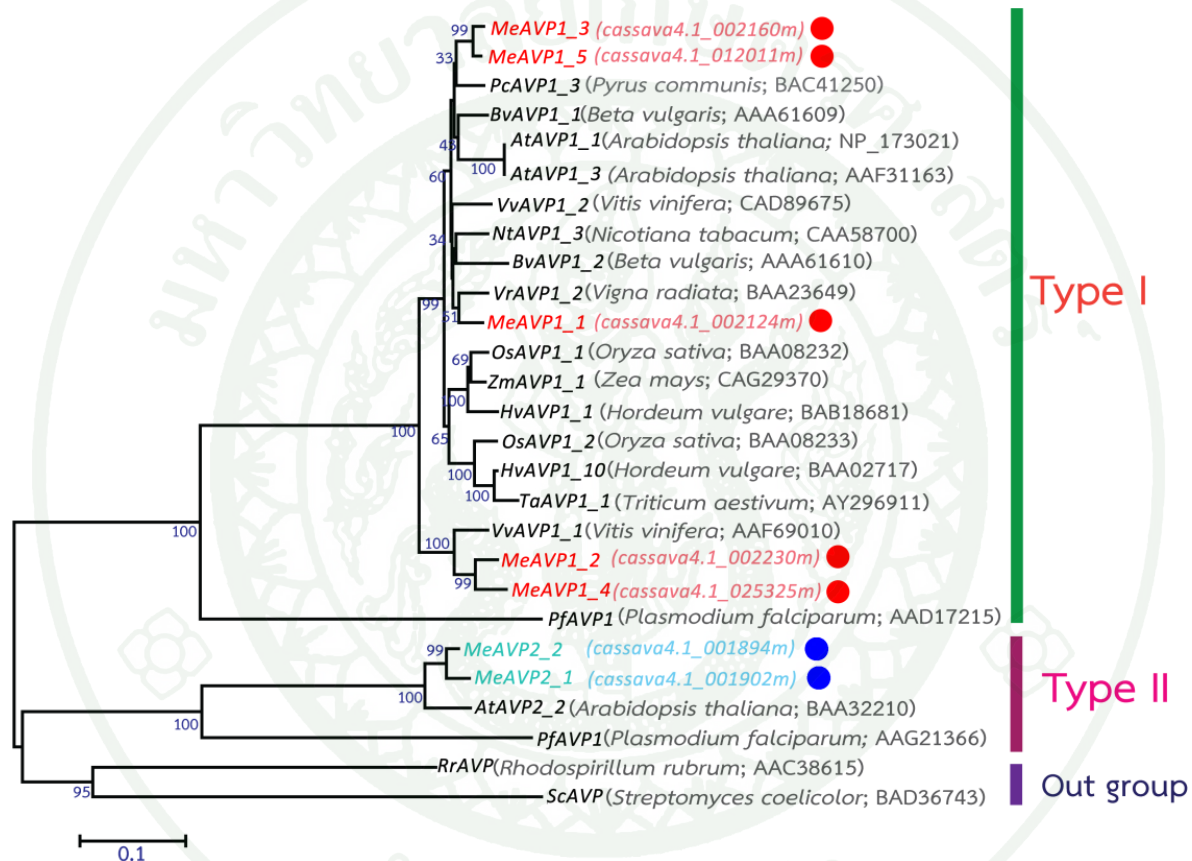
Residue positions: 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

MeAVP1_4 STGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRAGIKTVDVANKPVFGLIGLVGAMLPYWFSSAMT
MeAVP1_2 STGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRAGIKAVDVLTPKVFVIGLIGLVGAMLPYWFSSAMT
MeAVP1_1 ATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRASISTVDLTPKVFVIGLIGLVGAMLPYWFSSAMT
MeAVP1_3 ATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRASISTVDLTPKVFVIGLIGLVGAMLPYWFSSAMT
MeAVP1_5 ATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRASISTVDLTPKVFVIGLIGLVGAMLPYWFSSAMT
AtAVP1_1 ATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRAGIHTVDLTPKVIIGLIGLVGAMLPYWFSSAMT
AtAVP1_3 ATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRAGIHTVDLTPKVIIGLIGLVGAMLPYWFSSAMT
VvAVP1_2 ATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRASISTVDLTPKVFVIGLIGLVGAMLPYWFSSAMT
VvAVP1_1 ATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRQRTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRAGIHTVDLTPKVFVIGLIGLVGAMLPYWFSSAMT
OsAVP1_2 ATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRAGIHTVDLTPKVFVIGLIGLVGAMLPYWFSSAMT
OsAVP1_1 ATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHKIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFATGSAALVSLALPGAFVSRASISTVDLTPKVFVIGLIGLVGAMLPYWFSSAMT

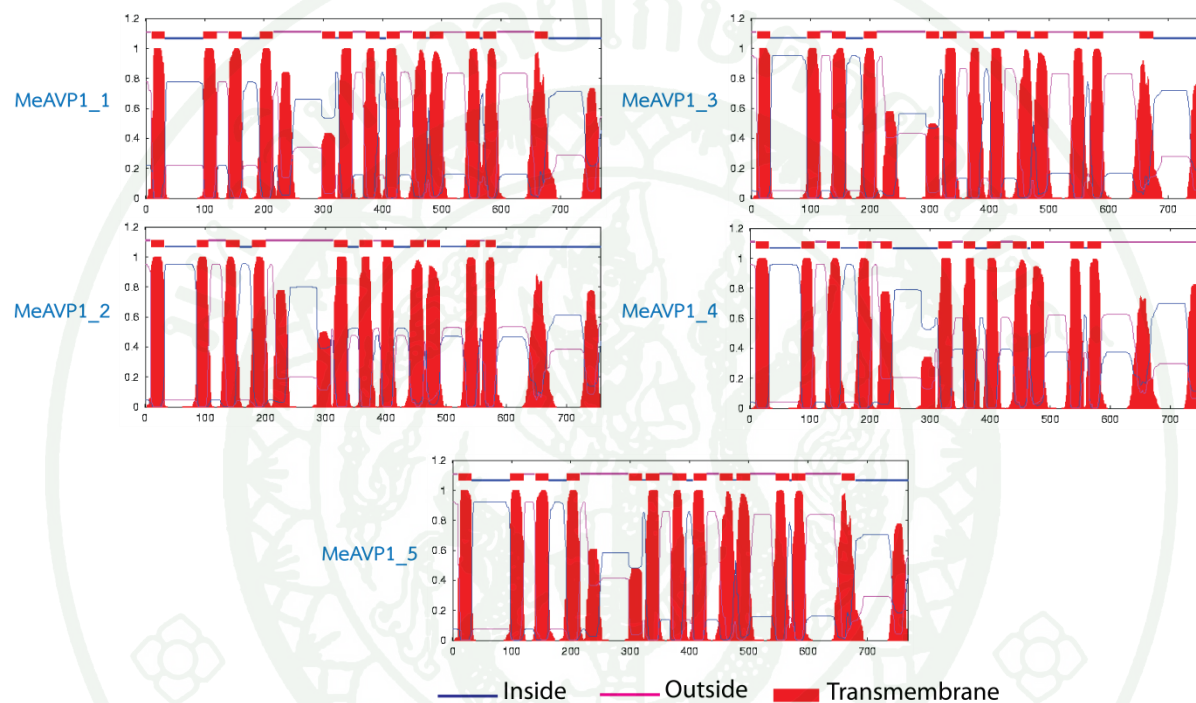
Residue positions: 710 720 730 740 750 760 770

MeAVP1_4 KKYLEAGASEHARSILGPKGSDAHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKLLK
MeAVP1_2 KKYLEAGASEHARLILGPKGSDPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKLLK
MeAVP1_1 KKYLEAGASEHARTILGPKGSEPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKLLK
MeAVP1_3 KKYLEAGASEHARTILGPKGSEPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKLLK
MeAVP1_5 KKYLEAGASEHARTILGPKGSEPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKLLK
AtAVP1_1 KKYLEAGVSEHAKSILGPKGSEPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKFYF
AtAVP1_3 KKYLEAGVSEHAKSILGPKGSEPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKFYF
VvAVP1_2 KKYLEAGSEHAKILGPKGSDPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKFIKW
VvAVP1_1 KKYLEAGASEHARSILGPKGSDPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKLLK
OsAVP1_2 KKYLEAGASEHARTILGPKGSDCHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKWF
OsAVP1_1 KKYLEAGASEHARTILGPKGSDCHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFAATHGGILFKWF

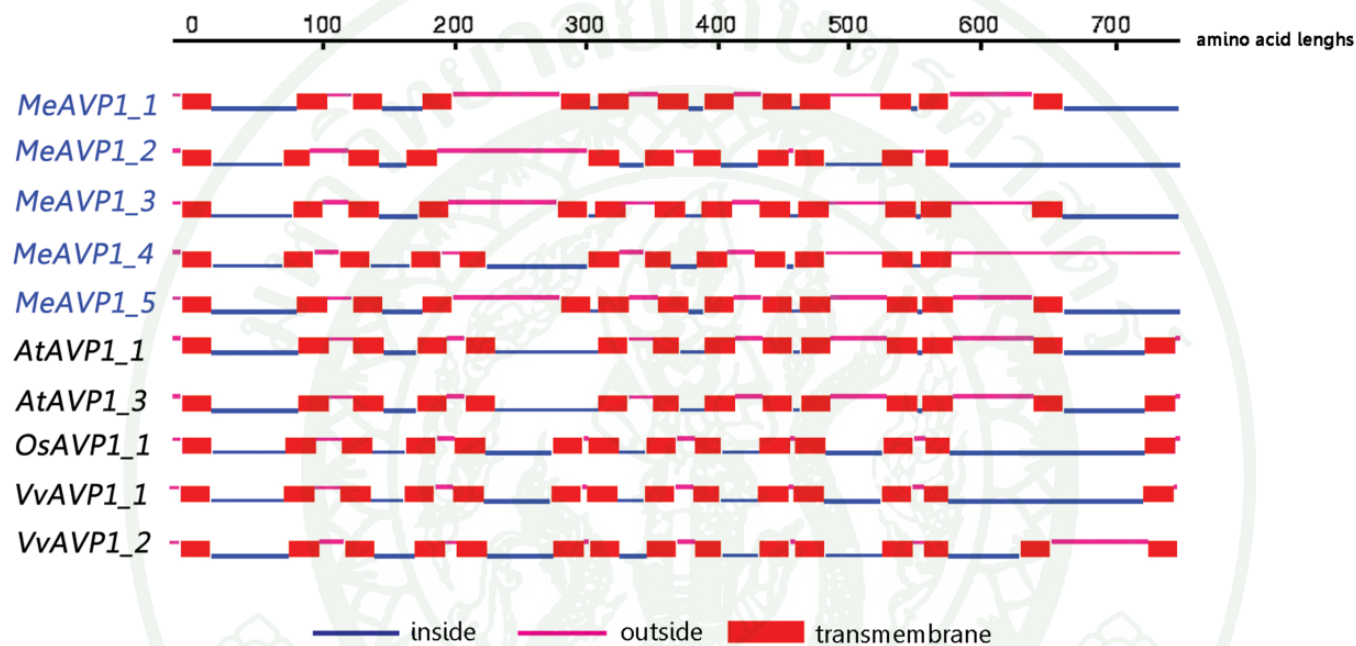
ภาพที่ 18 (ต่อ)



ภาพที่ 19 แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของยีนกลุ่ม AVP ของมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับยีนพืชแม่แบบ *AtAVP1* ใน *Arabidopsis* และยีนที่ใกล้เคียงกันในพืชอื่น โดยแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Type I และ Type II กลุ่มยีนของมันสำปะหลังที่อยู่ในกลุ่ม Type I ถูกแสดงด้วยอักษรแดง ส่วนกลุ่มยีนที่อยู่ในกลุ่ม Type II ถูกแสดงด้วยอักษรสีน้ำเงิน



ภาพที่ 20 แสดงผลการจำลองโครงสร้างโปรตีนที่เป็น transmembrane protein ด้วยโปรแกรม TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) สำหรับโปรตีนจากยีนเป้าหมายในมันสำปะหลัง 5 ยีนประกอบด้วยยีน *MeAVP1_1* *MeAVP1_2* *MeAVP1_3* *MeAVP1_4* และ *MeAVP1_5* โดยโปรตีนส่วนที่เป็น transmembrane domain ถูกแสดงในแถบสีเหลี่ยมสีแดง ส่วนที่อยู่ภายใน (inside) และภายนอก (outside) เยื่อหุ้มเซลล์ ถูกแสดงด้วยเส้นสีน้ำเงินและสีชมพูตามลำดับ



ภาพที่ 21 แสดงการเปรียบเทียบแบบจำลองของ transmembrane protein ของโปรตีนจากยีนเป้าหมายในมันสำปะหลัง *MeAVP1_1* *MeAVP1_2* *MeAVP1_3* *MeAVP1_4* และ *MeAVP1_5* กับโปรตีนจากยีนแม่แบบ *AtAVP1* และยีนอื่นที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล NCBI โดยโปรตีนส่วนที่เป็น transmembrane domain ถูกแสดงในแถบสีเหลี่ยมสีแดง ส่วนที่อยู่ภายใน (inside) และภายนอก (outside) เยื่อหุ้มเซลล์ ถูกแสดงด้วยเส้นสีน้ำเงิน และสีชมพูตามลำดับ

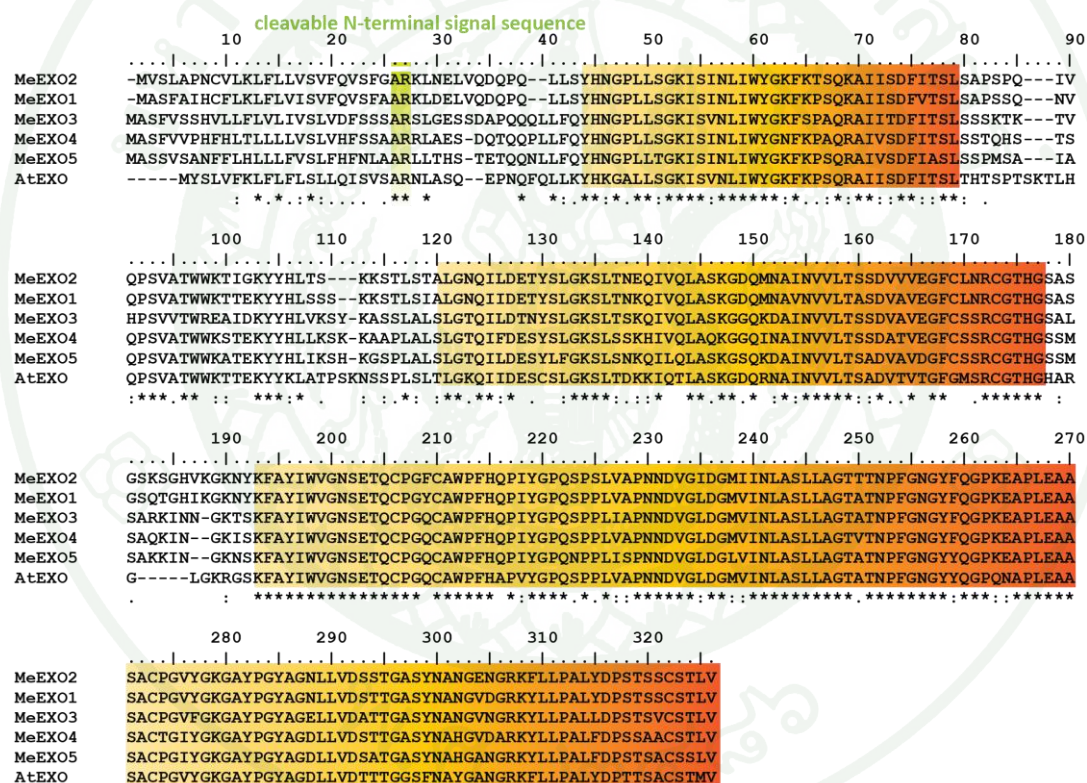
2.2. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน และการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของยีนกลุ่ม *EXO*

จากการสืบหายีนเป้าหมายในกลุ่ม *EXO* จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลังด้วยยีนแม่แบบ *AtEXO* พบยีนที่มีโครงสร้างคล้ายกันจำนวน 9 ยีน ตามตารางที่ 7 ดังนั้นจึงนำสมาชิกยีนทั้ง 9 ยีนมาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน และวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการควบคู่กับยีนแม่แบบ *AtEXO* และยีนที่มีความคล้ายคลึงกันในพืชชนิดอื่นๆ จากฐานข้อมูล NCBI (ภาพที่ 23) ทำให้พบว่าจากสมาชิกยีน *EXO* ในฐานข้อมูลมันสำปะหลังทั้ง 9 ยีน มีเพียง 5 ยีนเท่านั้นที่ถูกจัดหมู่ให้อยู่ในกลุ่มที่มีความใกล้เคียงกับยีนแม่แบบ *AtEXO* คือยีน *MeEXO1* *MeEXO2* *MeEXO3* *MeEXO4* และ *MeEXO5* ตามที่ตั้งชื่อใหม่ในตารางที่ 7 ซึ่งเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการแล้วจะเห็นว่ายีนทั้ง 5 ยีน นี้มีความใกล้เคียงกันกับยีนแม่แบบเป็นอย่างมาก และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้ง 5 ยีนไปเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนจากยีน *AtEXO* แสดงให้เห็นว่ายีนทั้ง 5 ยีน มีการอนุรักษ์กรดอะมิโนค่อนข้างสูง (ภาพที่ 22) จากการศึกษาตำแหน่งของโปรตีน (protein localization) ของ *EXO* ใน *Arabidopsis* พบว่าโปรตีน *EXO* มีลักษณะเป็น extracellular protein ดังนั้นจึงทำการศึกษาคำแหน่งของโปรตีนจากกลุ่มยีน *EXO* ของมันสำปะหลัง โดยใช้โปรแกรม ProtComp 9.0 (www.softberry.com) ที่สามารถคาดคะเนตำแหน่งของโปรตีนได้ (ตารางที่ 8) พบว่ายีน *MeEXO1* *MeEXO3* และ *MeEXO4* น่าจะเป็น extracellular protein ที่ระดับคะแนน 10.00 8.94 และ 7.62 ตามลำดับ ส่วน *MeEXO2* น่าจะเป็น plasma membrane protein ที่ระดับคะแนน 5.17 และ *MeEXO5* น่าจะเป็นโปรตีนที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึม

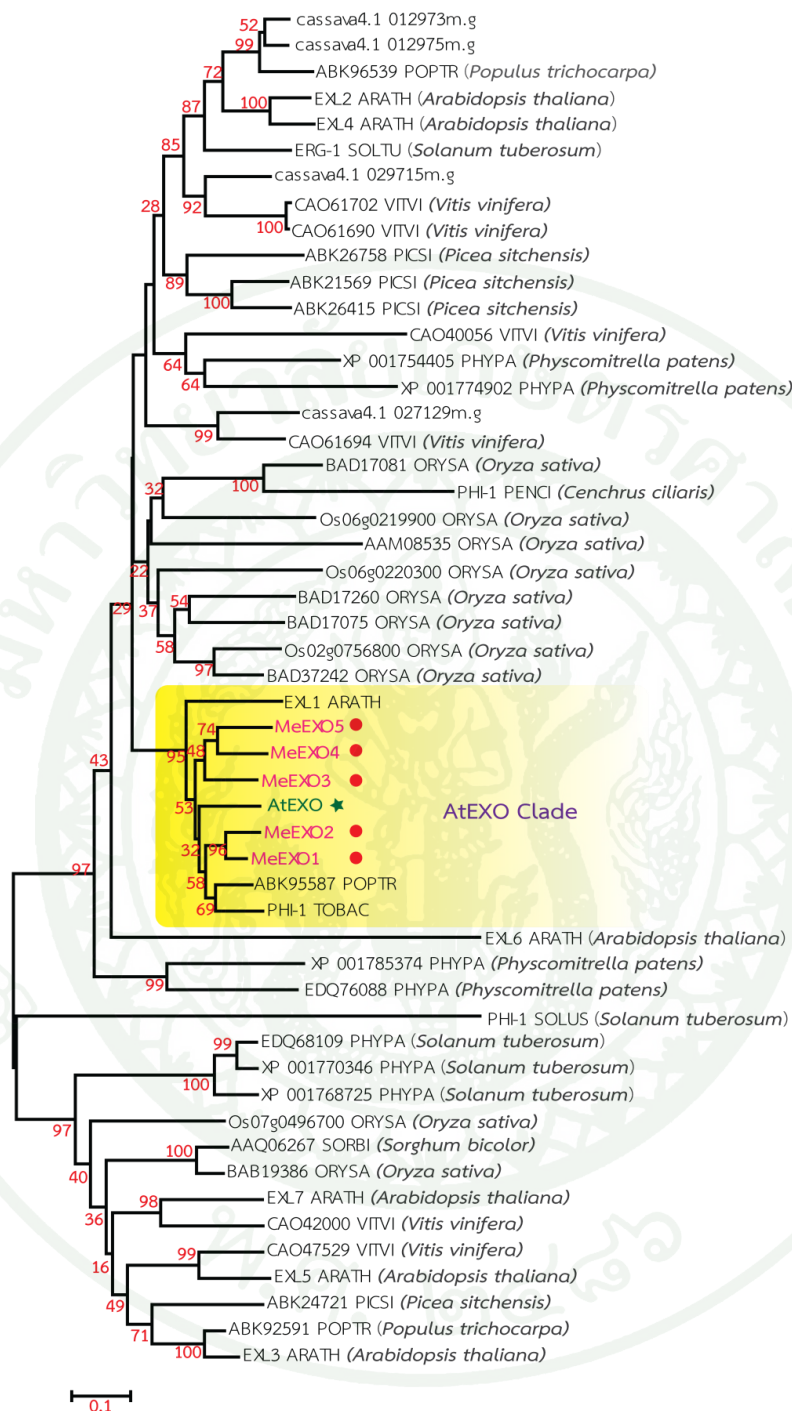
2.3. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน และการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของยีนกลุ่ม *MRB1*

จากตารางที่ 7 ได้แสดงผลของการสืบหายีน *MRB1* จากฐานข้อมูลมันสำปะหลัง phytozome ซึ่งพบยีนที่ใกล้เคียงกับยีนแม่แบบ *AtMRB1* จำนวน 6 ยีน จึงนำยีนที่สืบพบในฐานข้อมูลมันสำปะหลังทั้งหมดมาทำการศึกษาวเคราะห์เพิ่มเติมด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการเพื่อวิเคราะห์หายีนที่มีความสัมพันธ์กับพืชแม่แบบ *AtMRB1* มากที่สุด (ภาพที่ 25) ซึ่งผลที่ได้จะเห็นได้ว่ามีเพียงยีนจากมันสำปะหลังรหัส cassava4.1_007974m.g และ cassava4.1_008956m.g เพียง 2 ยีนเท่านั้นที่ถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีนแม่แบบ *AtMRB1* จึงได้ทำการตั้งชื่อใหม่เป็นยีน *MeMRB1_1* และยีน *MeMRB1_2* และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของทั้ง 2 ยีนกับยีนแม่แบบ *AtMRB1* พบว่าใน *MeMRB1_2* มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน

มีโนจำนวนมากในช่วง N-terminal ทำให้ลำดับกรดอะมิโนของ *MeMRB1_1* มีความคล้ายกับกรดอะมิโนของยีน *AtMRB1* มากกว่า (ภาพที่ 24) นอกจากนี้ในการศึกษาชิ้นแม่แบบ *AtMRB1* พบว่ามีการแสดงออกโดยให้โปรตีนที่มีลักษณะเป็น transmembrane protein จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยการวิเคราะห์แบบจำลอง transmembrane protein ของยีนทั้งสองในมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับแบบจำลองโปรตีนของยีนแม่แบบ *AtMRB1* (ภาพที่ 26) ผลจากแบบจำลองที่ได้จะแสดงให้เห็นว่าโปรตีนจากยีน *MeMRB1_1* ได้มีการอนุรักษ์โดเมนโปรตีนที่เป็น transmembrane protein ของโปรตีนของยีนแม่แบบ *AtMRB1* เอาไว้แต่เมื่อพิจารณาโปรตีนที่ได้จากยีน *MeMRB1_2* จะเห็นได้ว่า transmembrane domain 2 โดเมนแรกได้หายไปจากโครงสร้างโปรตีนของยีน *MeMRB1_2*



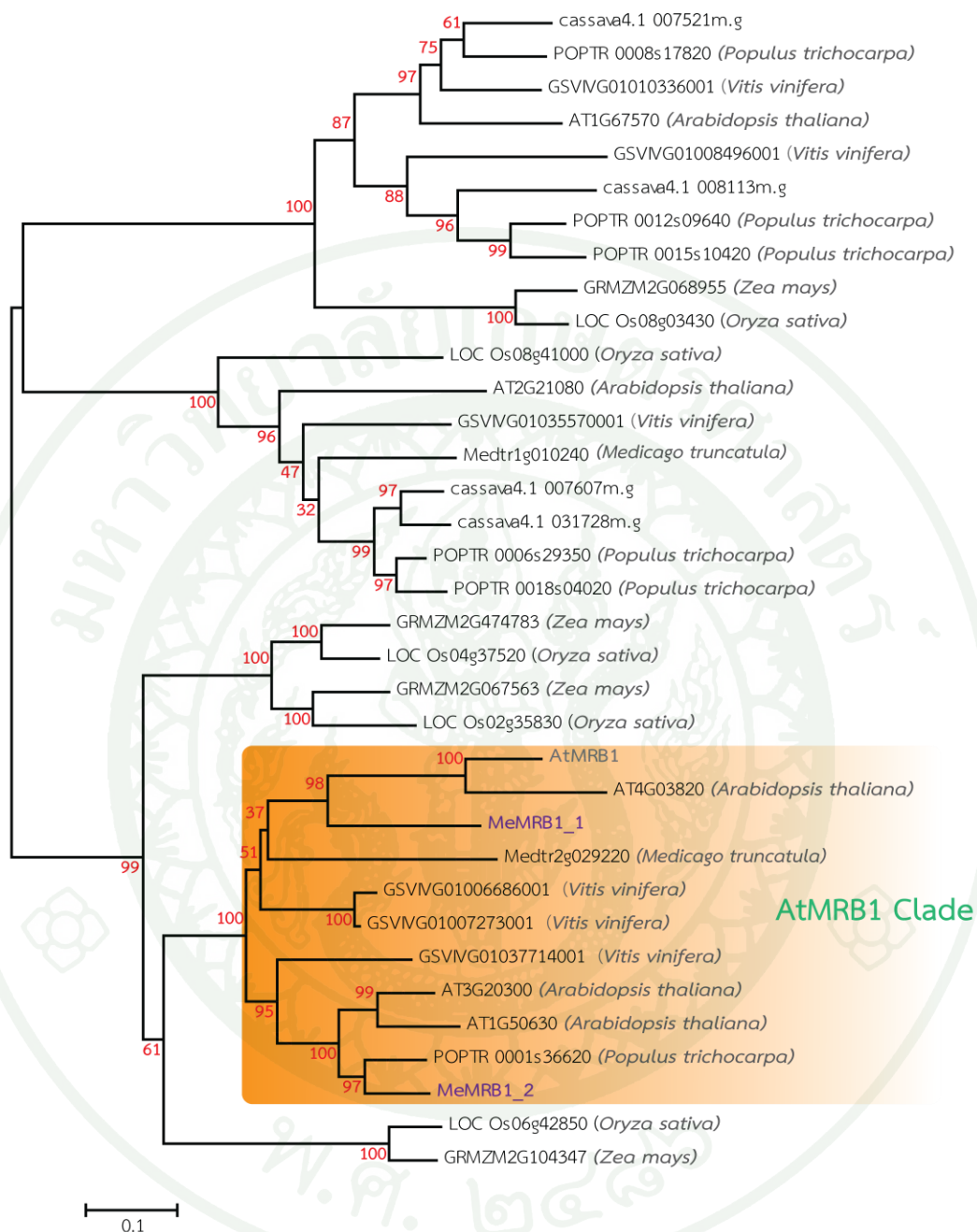
ภาพที่ 22 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EXO ในมันสำปะหลังประกอบด้วยโปรตีน MeEXO1 MeEXO2 MeEXO3 MeEXO4 และ MeEXO5 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AtEXO จากพืชแม่แบบ *Arabidopsis* ซึ่งบริเวณอนุรักษ์ถูกเน้นด้วยแถบสีส้ม เหลือง และตำแหน่งที่คาดว่าเป็น cleavable N-terminal signal sequence ถูกเน้นด้วยแถบสีเขียว



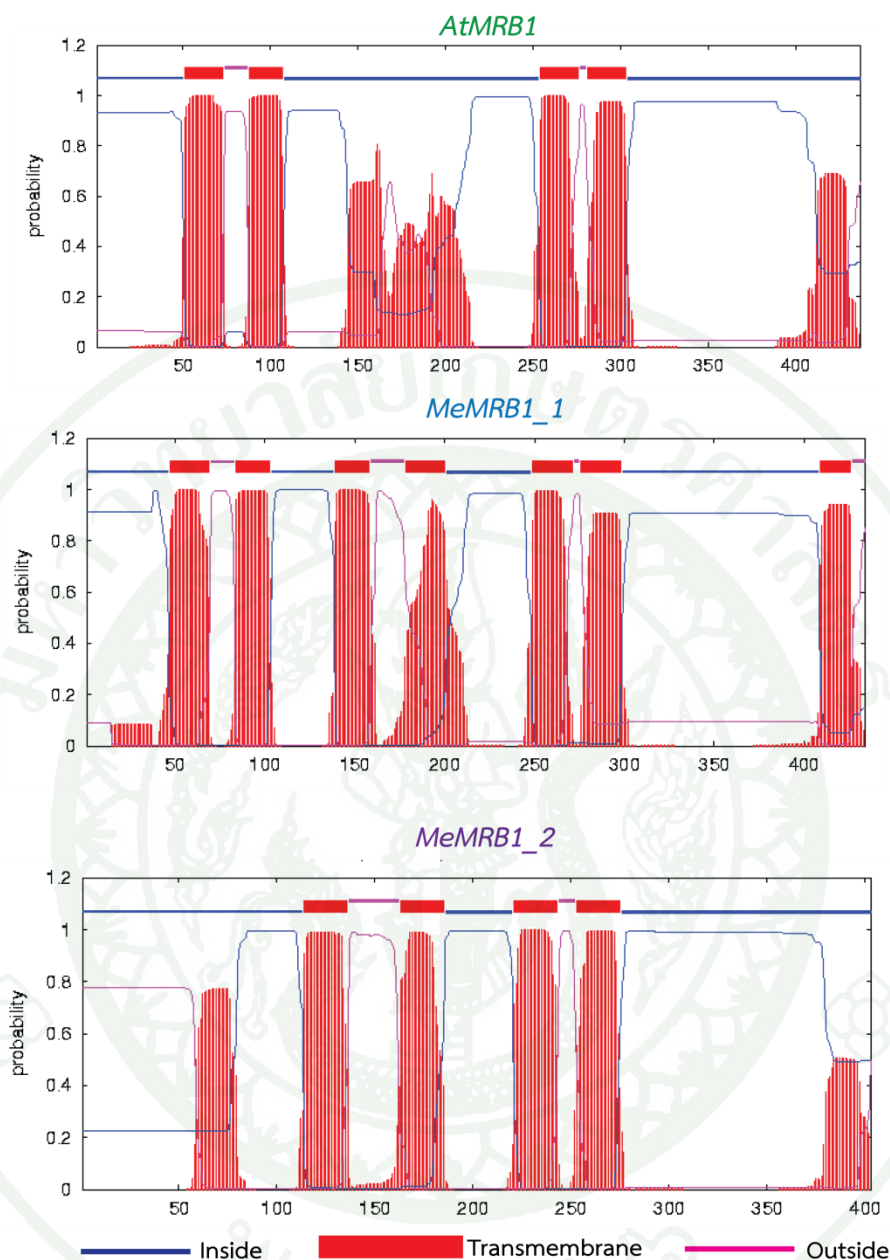
ภาพที่ 23 แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของยีนกลุ่ม EXO ของมันสำปะหลัง เปรียบเทียบกับพืชแม่แบบ *AtEXO* (ตัวอักษรสีเขียว) และยีนที่ใกล้เคียงกันในพืชอื่นจากฐานข้อมูล NCBI โดยยีนจากมันสำปะหลังที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับยีน *AtEXO* ถูกแสดงด้วยอักษรสีชมพู

ตารางที่ 8 แสดงผลวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีน (protein localization) ของยีน *MeEXO1* *MeEXO2* *MeEXO3* *MeEXO4* และ *MeEXO5* ด้วยโปรแกรม ProtComp 9.0 (www.softberry.com) โดยคะแนนสูงสุดของโปรตีนเป้าหมายถูกแสดงด้วยตัวอักษรหนา

ตำแหน่งโปรตีน	คะแนนของแต่ละยีน (score)				
	<i>MeEXO1</i>	<i>MeEXO2</i>	<i>MeEXO3</i>	<i>MeEXO4</i>	<i>MeEXO5</i>
Nuclear	-	-	0.21	0.37	-
Plasma membrane	-	5.17	-	2.00	-
Extracellular	10.00	1.62	8.94	7.62	1.06
Cytoplasmic	-	1.04	-	-	5.96
Endoplasmic reticulum	-	1.26	-	-	-
Peroxisomal	-	-	-	-	-
Golgi	-	-	-	-	1.40
Chloroplast	-	0.90	0.85	-	-
Vacuolar	-	-	-	-	1.57



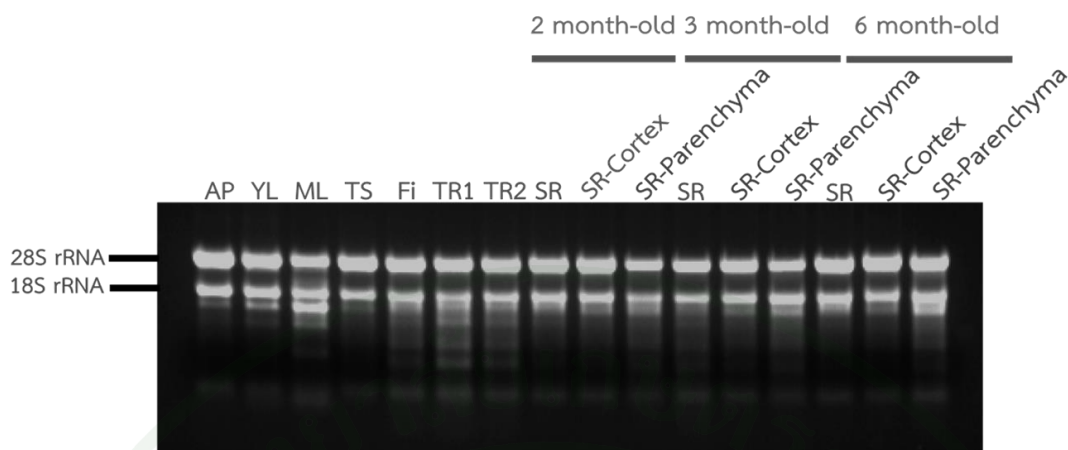
ภาพที่ 25 แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของยีนกลุ่ม *MRB1* ของมันสำปะหลัง เปรียบเทียบกับพืชแม่แบบ *AtMRB1* (ตัวอักษรสีเขียว) และยีนที่ใกล้เคียงกันในพืชอื่นจากฐานข้อมูล NCBI โดยยีนจากมันสำปะหลังที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับยีน *AtMRB1* ถูกแสดงด้วยอักษรสีม่วง



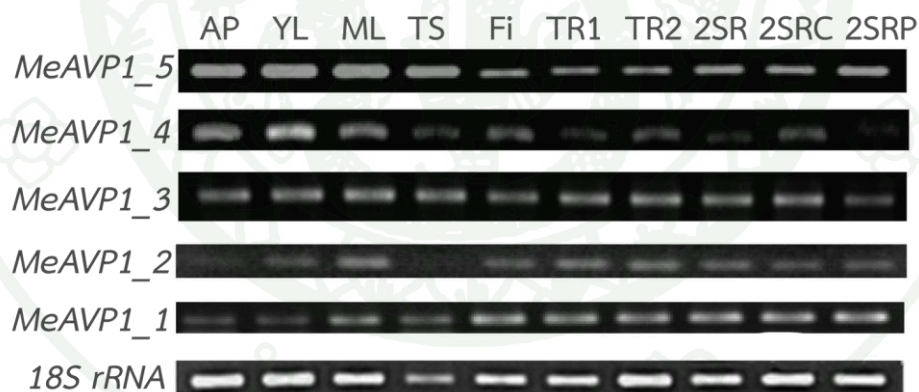
ภาพที่ 26 แสดงผลการจำลองโครงสร้างโปรตีนที่เป็น transmembrane protein ด้วยโปรแกรม TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) ของโปรตีนจากยีน *MRB1* ในมันสำปะหลัง 2 ยีนประกอบด้วยยีน *MeMRB1_1* และยีน *MeMRB1_2* เปรียบเทียบกับโครงสร้างโปรตีนจากยีนแม่แบบ *AtMRB1* โดยส่วนที่เป็น transmembrane domain จะแสดงในแถบสีเหลี่ยมสีแดง ส่วนที่อยู่ภายใน (inside) และภายนอก (outside) เชื้อหุ้มเซลล์ จะถูกแสดงด้วยเส้นสีน้ำเงินและสีชมพูตามลำดับ

3. การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* ของมันสำปะหลัง

การศึกษาแบบแผนการแสดงออกจะศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายในกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* ในเนื้อเยื่อมันสำปะหลังส่วนต่างๆ ที่ระดับอายุที่แตกต่างกันเพื่อเปรียบเทียบวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนว่ามีการแสดงออกในส่วนใดของมันสำปะหลังและในช่วงอายุใดของรากสะสมอาหาร ดังนั้นในการศึกษาขั้นนี้จึงต้องอาศัยการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมมาจากแปลงปลูก เนื้อเยื่อที่เก็บรวบรวมมีในส่วนของส่วนของพืชที่อยู่เหนือพื้นดินหรือ above ground ที่มีส่วนของลำต้นและใบ โดยจะเก็บแยกส่วนของปลายยอด (shoot apex; AP), ใบอ่อน (young leaf; YL), ใบแก่ (mature leaf; ML) และลำต้นส่วนบน (top stem; TS) ในส่วนของเนื้อเยื่อส่วนใต้ดินหรือ underground ได้เก็บในส่วนของรากสะสมอาหารตั้งแต่ระยะ รากฝอย (fibrous root; FT) รากที่เริ่มมีการโป่งพองระดับที่ 1 ระดับที่ 2 (transition root; TR และ TR2) และรากสะสมอาหาร ในส่วนของรากสะสมอาหารจะเก็บในอายุที่แตกต่างกันที่ 2, 3 และ 6 เดือน (storage root; 2SR, 3SR และ 6SR) เนื่องจากเนื้อเยื่อรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังมีการแยกชั้นเป็น 2 ชั้น ซึ่งการเก็บเนื้อเยื่อจะเก็บทั้งแบบรวมทั้ง 2 ชั้น และแบบแยกชั้นเฉพาะชั้น cortex (SR-cortex; SRC) และชั้น parenchyma (SR-parenchyma; SRP) (ภาพที่ 13) ตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้นจะถูกนำมาสกัด RNA และนำไปตรวจสอบคุณภาพด้วย spectrophotometer และผ่านกรรมวิธี denaturing gel electrophoresis (ภาพที่ 27) จากผลที่ได้จะเห็นว่าคุณภาพของ RNA มีคุณภาพดีไม่มีการเสียสภาพของ RNA หรือ RNA degradation ฉะนั้นจึงสามารถนำ RNA ที่ได้ไปศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่อไป ซึ่ง RNA ที่สกัดได้จากทุกเนื้อเยื่อจะถูกนำไปสร้างสาย cDNA ด้วยปฏิกิริยาหลูโซผันกลับ หรือ reverse transcription เพื่อนำสาย cDNA มาใช้เป็นแม่แบบในการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยกรรมวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้วิธีการนี้เพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายในเนื้อเยื่อต่างๆเปรียบเทียบกัน ทั้งนี้การทำการวิธีดังกล่าวจะทำการควบคู่ไปกับยีน *18 sRNA* ซึ่งเป็น house-keeping gene ที่มีระดับการแสดงออกคงที่ในทุกเนื้อเยื่อของพืช



ภาพที่ 27 ภาพการทำ denaturing gel electrophoresis ของ RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมันสำปะหลังประกอบด้วย ส่วนยอด (AP), ใบอ่อน (YL), ใบแก่ (ML), ลำต้นส่วนบน (TS), รากฝอย (Fi), รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1, 2 (TR1, TR2), รากสะสมอาหาร (SR), เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (SR-Cortex) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (SR- parenchyma)

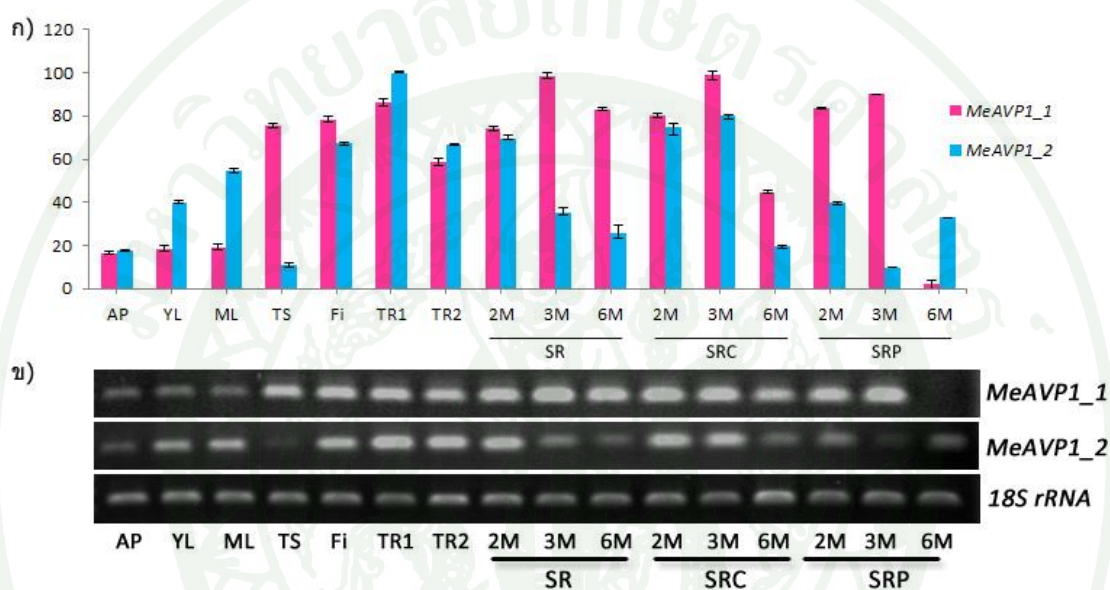


ภาพที่ 28 ผลเจลอเล็กโตรโฟเรซิสของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeAVP1_1*, *MeAVP1_2* *MeAVP1_3* *MeAVP1_4* และ *MeAVP1_5* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP), ใบอ่อน (YL), ใบแก่ (ML), ลำต้นส่วนบน (TS), รากฝอย (Fi), รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1, 2 (TR1, TR2), รากสะสมอาหาร (2SR), เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (2SRC) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (2SRP) ที่อายุ 2 เดือน

3.1. การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1* ของมันสำปะหลัง

ในการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1* ของมันสำปะหลัง จะศึกษาจำเพาะลงไปในกลุ่มยีนที่อยู่ในกลุ่มโปรตีน H^+ -PPases Type I ตามที่ปรากฏในแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของกลุ่มยีน *AVP* (ภาพที่ 19) ซึ่งประกอบด้วยยีน *MeAVP1_1* *MeAVP1_2* *MeAVP1_3* *MeAVP1_4* และ *MeAVP1_5* จำนวน 5 ยีน โดยการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนทั้ง 5 ในเบื้องต้นจะทำการตรวจสอบแบบแผนการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อส่วนของยอด ใบ ลำต้น และส่วนของรากฝอย รากโป่งพอง และรากสะสมอาหารที่อายุ 2 เดือนก่อน โดยพบว่า ยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* มีการแสดงออกที่สูงชัดเจนในเนื้อเยื่อมันสำปะหลังส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อส่วน underground คือเนื้อเยื่อในทุกระยะของรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง ซึ่งยีนทั้ง 2 มีการแสดงออกสูงตั้งแต่ระยะรากฝอยจนถึงระยะรากสะสมอาหารที่มีอายุ 2 เดือน แต่ในทางกลับกันในส่วนของเนื้อเยื่อ above ground มีการแสดงออกที่น้อยกว่าเนื้อเยื่อส่วน underground อย่างเห็นได้ชัด เมื่อพิจารณาในส่วนของยีนที่เหลือ เช่น ยีน *MeAVP1_3* มีการแสดงออกที่คงที่เท่ากันทุกส่วนของเนื้อเยื่อพืชโดยไม่มีการแสดงออกโดดเด่นในเนื้อเยื่อใด ส่วนยีน *MeAVP1_4* และ *MeAVP1_5* พบว่ามีการแสดงออกสูงในส่วนของลำต้นและใบ หรือส่วนของเนื้อเยื่อ above ground มากกว่าในส่วน of underground (ภาพที่ 28) ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกยีนที่น่าจะมาบ่งชี้เกี่ยวกับการพัฒนาของรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังคือ ยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* ไปวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกอย่างละเอียดโดยเพิ่มในส่วนของเนื้อเยื่อรากสะสมอาหารที่มีอายุ 3 และ 6 เดือนเข้ามาในการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกด้วย (ภาพที่ 29ก และ ภาพที่ 29ข) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอ ด้วย Densitometer แล้วเทียบค่าความเข้มของแถบ ดีเอ็นเอ ของยีนในแต่ละเนื้อเยื่อกับความเข้มของแถบ ดีเอ็นเอของยีน *18S rRNA* แล้วจึงแปลงค่าออกมาดังที่แสดงในรูปกราฟแท่ง (ภาพที่ 29ก) ผลการวิเคราะห์การแสดงออกดังกล่าวจะเห็นได้ว่าในยีน *MeAVP1_1* มีการแสดงออกสูงมากในเนื้อเยื่อที่เป็นส่วนของรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง โดยเฉพาะรากสะสมอาหารในระยะ 3 เดือน จะมีการแสดงออกสูงที่สุด เมื่อพิจารณาในเรื่องของช่วงอายุของรากสะสมอาหารจะเห็นได้ว่าในทุกชั้นของเนื้อเยื่อรากสะสมอาหารจะมีการแสดงออกของยีน *MeAVP1_1* ที่คล้ายกัน กล่าวคือมีการแสดงออกของยีนตั้งแต่ระยะรากสะสมอาหารอายุ 2 เดือน และมีการเพิ่มการแสดงออกมากขึ้นเมื่อรากสะสมอาหารมีอายุ 3 เดือน แต่เมื่อรากได้พัฒนาจนถึงอายุ 6 เดือนระดับการแสดงออกของยีน *MeAVP1_1* กลับลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณชั้นเนื้อเยื่อส่วน parenchyma ของรากสะสมอาหารในอายุ 6 เดือนพบการลดระดับการแสดงออกลงอย่างชัดเจน จากนั้นเมื่อพิจารณาแบบแผนการแสดงออกของยีน *MeAVP1_2* จะพบว่ายีนมีการแสดงออกสูงมากในเนื้อเยื่อส่วนของรากที่มีการโป่งพอง (TR1, TR2) ซึ่งเป็นระยะที่

มีการเปลี่ยนแปลงจากรากปกติเป็นรากสะสมอาหาร และการแสดงออกของยีนยังคงพบการ
แสดงออกที่สูงในรากสะสมอาหารระยะ 2 เดือน จากนั้นระดับการแสดงออกของยีน *MeAVP1_2* จะ
ลดลงในรากสะสมอาหารที่มีอายุมากขึ้นคือรากสะสมอาหารที่มีอายุ 3 และ 6 เดือน นอกจากนี้เมื่อ
พิจารณาในเนื้อเยื่อของรากสะสมอาหารที่ต่างกันพบว่า ยีน *MeAVP1_1* มีการแสดงออกสูงทั้ง
เนื้อเยื่อ cortex และ parenchyma แต่ยีน *MeAVP1_2* มีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อชั้น cortex มากกว่า
ดังแสดงในภาพที่ 29ก และ ภาพที่ 29ข



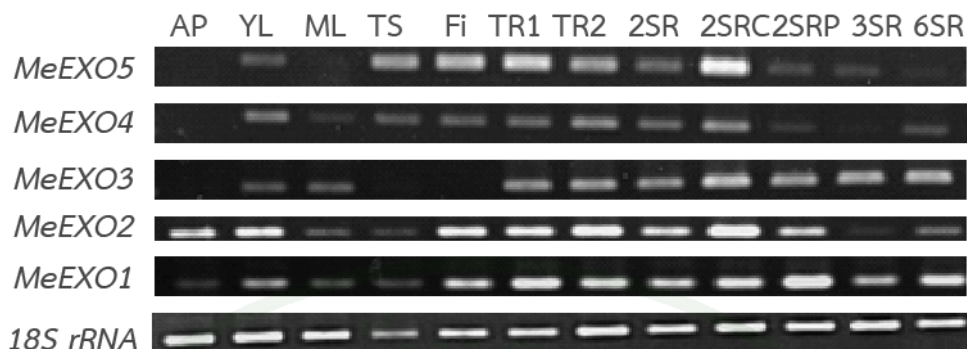
ภาพที่ 29 แสดงผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2*

ก) กราฟแสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *MeAVP1_1* (สีน้ำเงิน) และ *MeAVP1_2* (สีชมพู)

ข) ผลเจลอิลเล็กโตรโฟริซิสของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP) ใบอ่อน (YL) ใบแก่ (ML) ลำต้นส่วนบน (TS) รากฝอย (Fi) รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1, 2 (TR1, TR2) รากสะสมอาหาร (SR) เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (SRC) และเนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (SRP) ที่อายุ 2 เดือน (2M) 3 เดือน (3M) และ 6 เดือน (6M)

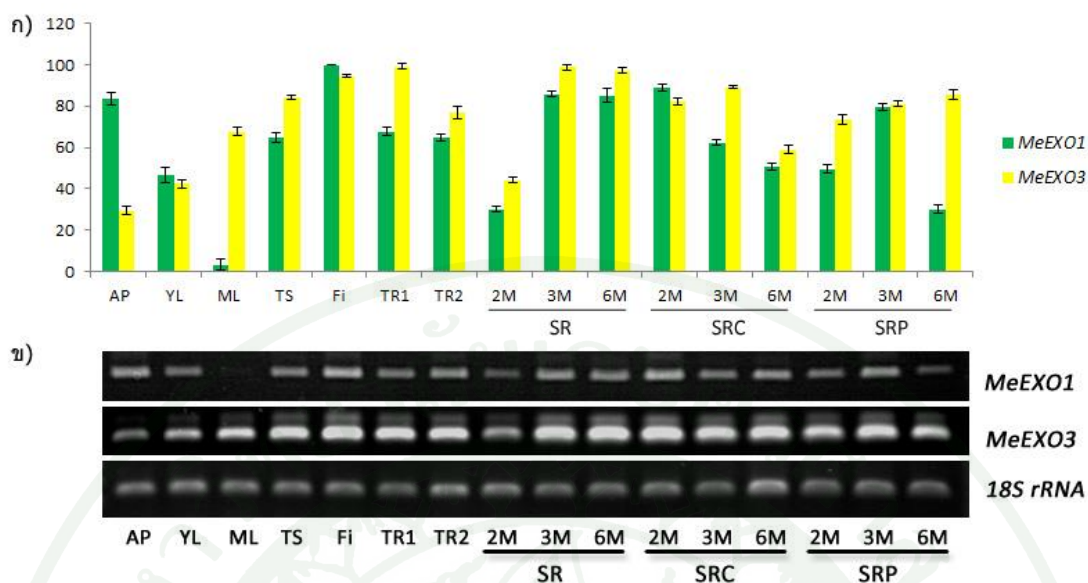
3.2. การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายกลุ่ม *EXO* ของมันสำปะหลัง

ผลการวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของกลุ่มยีน *EXO* (ภาพที่ 23) ทำให้สามารถแยกสมาชิกยีนมันสำปะหลังกลุ่ม *EXO* ที่มีความใกล้เคียงกับยีน *AtEXO* จากพืชแม่แบบ *Arabidopsis* จำนวน 5 ยีน และได้ตั้งชื่อยีนใหม่ตามตารางที่ 7 ได้แก่ *MeEXO1* *MeEXO2* *MeEXO3* *MeEXO4* และ *MeEXO5* จากนั้นเพื่อให้เข้าใจในหน้าที่และบทบาทของยีนกลุ่มนี้มากขึ้น จึงนำสมาชิกยีนทั้ง 5 ไปศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยการศึกษาในเบื้องต้น (ภาพที่ 30) พบว่าการแสดงออกของยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* มีแบบแผนการแสดงออกที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันคือระดับการแสดงออกของยีนมีการแสดงออกสูงต่อเนื่องในทุกระยะของรากสะสมอาหาร และมีการแสดงออกน้อยในส่วนของยอด ใบอ่อน ใบแก่ และลำต้นส่วนบน เมื่อพิจารณาต่อในส่วนของยีน *MeEXO2* พบว่ายีนมีการแสดงออกสูงตั้งแต่ส่วนยอด และ ใบอ่อนของมันสำปะหลัง จากนั้นระดับการแสดงออกลดต่ำลงในส่วนของใบแก่ และลำต้นส่วนบน เมื่อพิจารณาในส่วนของรากสะสมอาหารยีน *MeEXO2* มีการแสดงออกตั้งแต่ส่วนของรากฝอยจนถึงระยะรากสะสมอาหารอายุ 2 เดือน จากนั้นระดับการแสดงออกจะลดต่ำลงในในรากสะสมอาหารที่อายุมากขึ้นคือรากสะสมอาหารอายุ 3 และ 6 เดือน ซึ่งรูปแบบการแสดงออกของยีน *MeEXO2* ในเฉพาะส่วนของรากสะสมอาหาร มีลักษณะการแสดงออกคล้ายคลึงกับรูปแบบการแสดงออกของยีน *MeEXO4* และ *MeEXO5* คือระดับการแสดงออกของยีนลดลงอย่างชัดเจนในเนื้อเยื่อรากสะสมอาหารที่มีอายุมากขึ้น แต่ยีน *MeEXO4* และ *MeEXO5* มีการแสดงออกต่ำในส่วนของยอด และใบแก่ต่างจากยีน *MeEXO2* จากผลดังกล่าวจึงให้ความสำคัญกับยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* ซึ่งมีการแสดงออกของยีนที่ต่อเนื่องในทุกระยะของรากสะสมอาหาร นอกจากนี้การคาดคะเนตำแหน่งของโปรตีน (ตารางที่ 8) ยังชี้ให้เห็นว่าทั้ง *MeEXO1* และ *MeEXO3* แสดงออกเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็น extracellular protein เช่นเดียวกับที่พบใน *AtEXO* ในพืชแม่แบบ *Arabidopsis* ดังนั้นจึงคัดเลือกทั้งสองยีน ไปศึกษาต่อด้วยการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกโดยละเอียดต่อไปด้วยเนื้อเยื่อมันสำปะหลังทั้ง 16 ตัวอย่างเหมือนที่ได้ดำเนินการกับยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2*



ภาพที่ 30 ผลเจลอิลีคโตรโฟรีซิสของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeEXO1*, *MeEXO2*, *MeEXO3*, *MeEXO4* และ *MeEXO5* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP) ใบอ่อน (YL) ใบแก่ (ML) ลำต้นส่วนบน (TS) รากฝอย (Fi) รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1 2 (TR1 TR2) รากสะสมอาหาร (2SR) เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (2SRC) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (2SRP) ที่อายุ 2 เดือน และรากสะสมอาหารที่อายุ 3 เดือน (3SR) และ 6 เดือน (6SR)

จากการศึกษาแบบแผนการแสดงออกโดยละเอียดสำหรับยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* พบว่าการแสดงออกของทั้ง 2 ยีน ยังคงมีการแสดงออกที่คล้ายกันอยู่ โดยเมื่อพิจารณาที่ยีน *MeEXO3* ในเนื้อเยื่อของรากสะสมอาหารมีการแสดงออกที่สูงในทุกระยะของรากสะสมอาหาร โดยมีการแสดงออกสูงที่สุดในระยะรากสะสมอาหารที่เริ่มมีการโป่งพอง (TR1) และเมื่อพิจารณาในเนื้อเยื่อ cortex และ parenchyma ของรากสะสมอาหาร การแสดงออกของยีน *MeEXO3* ยังคงมีการแสดงออกสูงในทุกช่วงอายุของรากสะสมอาหารแต่มีการแสดงน้อยในรากสะสมอาหารอายุ 2 เดือน ส่วนในยีน *MeEXO1* การแสดงออกในส่วนของแต่ละระยะพัฒนาของรากสะสมอาหารมีความคล้ายคลึงกับยีน *MeEXO3* แต่กลับพบระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันในส่วนยอดและใบ กล่าวคือ ยีน *MeEXO1* มีการแสดงออกในส่วนปลายยอดที่สูง และพบการแสดงออกในใบอ่อนและลำต้นส่วนบน แต่ในส่วนของใบแก่แทบไม่พบการแสดงออกของยีน ตามที่ปรากฏในภาพที่ 31ก และภาพที่ 31ข



ภาพที่ 31 แสดงผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3*

ก) กราฟแสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *MeEXO1* (สีเขียว) และ *MeEXO3* (สีเหลือง)

ข) ผลเจลอิลเล็กโตรโฟริซิสของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP) ใบอ่อน (YL) ใบแก่ (ML) ลำต้นส่วนบน (TS) รากฝอย (Fi) รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1, 2 (TR1, TR2) รากสะสมอาหาร (SR) เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (SRC) และเนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (SRP) ที่อายุ 2 เดือน (2M) 3 เดือน (3M) และ 6 เดือน (6M)

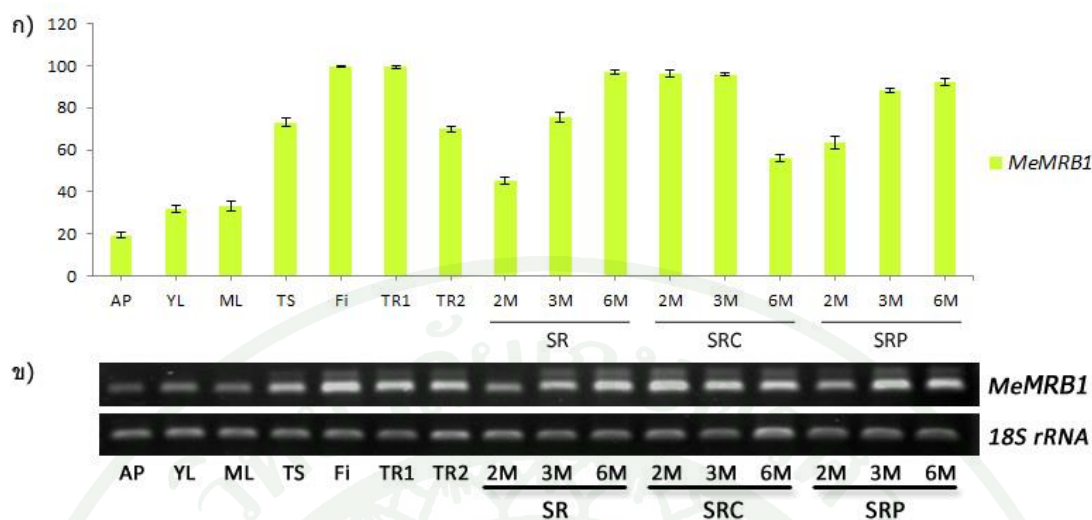
3.3. การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายกลุ่ม *MRB1* ของมันสำปะหลัง

ยีน *MeMRB1_1* และ *MeMRB1_2* ของมันสำปะหลังเป็นยีนที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีนแม่แบบ *AtMRB1* จาก *Arabidopsis* ตามที่แสดงในแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของกลุ่มยีน *MRB1* ในภาพที่ 25 ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกทั้ง 2 ยีน ไปศึกษาแบบแผนการแสดงออกด้วยวิธีการ semi-quantitative RT-PCR โดยในการศึกษาขั้นต้นพบว่ายีน *MeMRB1_1* มีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อส่วนของรากสะสมอาหารในอายุ 2 เดือน โดยเฉพาะในรากสะสมอาหารชั้น cortex มีระดับการแสดงออกสูงสุด แต่พบว่าระดับการแสดงออกของยีนลดลงในชั้น parenchyma

เมื่อพิจารณาในส่วนของยีน *MeMRB1_2* พบว่ามีระดับการแสดงออกที่ต่ำมากในทุกเนื้อเยื่อของพืชมันสำปะหลัง (ภาพที่ 32) ดังนั้นจากผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกขั้นต้น จึงได้คัดเลือกเฉพาะยีน *MeMRB1_1* ที่มีการแสดงออกเด่นชัดในส่วนของรากสะสมอาหาร นำไปศึกษาแบบแผนการแสดงออกอย่างละเอียด (ภาพที่ 33ก และภาพที่ 33ข) จากผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกอย่างละเอียดจะเห็นได้ชัดว่ายีน *MeMRB1_1* มีระดับการแสดงออกต่ำในส่วนของยอดและใบ แต่มีการแสดงออกสูงอย่างเด่นชัดในเนื้อเยื่อในแต่ละระยะของรากสะสมอาหาร และเมื่อพิจารณาในส่วนของรากสะสมอาหารในช่วงอายุที่ต่างกัน จะเห็นว่าระดับการแสดงออกของยีนจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากรากสะสมอาหารอายุน้อยไปสู่รากสะสมอาหารอายุมาก แต่เมื่อพิจารณาผลเพิ่มเติมของการเปรียบเทียบลักษณะการแสดงออกในชั้นเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันทั้ง 2 ชั้นในรากสะสมอาหาร คือชั้นเนื้อเยื่อ cortex และ ชั้นเนื้อเยื่อ parenchyma พบว่าการแสดงออกของเนื้อเยื่อมีการแสดงออกของเนื้อเยื่อตามอายุที่สวนทางกัน กล่าวคือเมื่อช่วงอายุของรากสะสมอาหารที่มากขึ้นการแสดงออกของยีน *MeMRB1_1* ในเนื้อเยื่อชั้น cortex ลดต่ำลง แต่ในส่วนของเนื้อเยื่อชั้น parenchyma การแสดงออกของยีน *MeMRB1_1* กลับมีทิศทางที่ตรงข้ามกันคือมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเมื่อรากสะสมอาหารมีอายุที่มากขึ้น จากนั้นเมื่อสังเกตผลในรากสะสมอาหารในช่วงระยะเริ่มต้นคือในส่วนของรากฝอย และรากที่เริ่มโป่งพอง จะเห็นว่าการแสดงออกของยีนมีการแสดงออกสูงเริ่มมาตั้งแต่ระยะรากฝอย แต่เมื่อเข้ามาสู่ระยะรากสะสมอาหารที่มีการเริ่มโป่งพองขึ้นที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน *MeMRB1_1* มีการแสดงออกลดลง และลดลงต่อไปอีกเมื่อรากสะสมอาหารเข้าสู่ระยะรากโป่งพองขึ้นที่ 2 (ภาพที่ 33ก)



ภาพที่ 32 ผลเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeMRB1_1* และ *MeMRB1_2* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP) ใบอ่อน (YL) ใบแก่ (ML) ลำต้นส่วนบน (TS) รากฝอย (Fi) รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1 2 (TR1 TR2) รากสะสมอาหาร (2SR) เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (2SRC) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (2SRP) ที่อายุ 2 เดือน



ภาพที่ 33 แสดงผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีน *MeMRB1_1*

ก) กราฟแสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *MeMRB1_1*

ข) ผลเจลอิลเล็กโตรโฟรีซิสของการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน *MeMRB1_1* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของม้นสำปะหลังเป็นแม่แบบ ประกอบด้วย ส่วนยอด (AP) ใบอ่อน (YL) ใบแก่ (ML) ลำต้นส่วนบน (TS) รากฝอย (Fi) รากเริ่มโป่งพองระยะที่ 1, 2 (TR1, TR2) รากสะสมอาหาร (SR) เนื้อเยื่อ cortex ของรากสะสมอาหาร (SRC) และ เนื้อเยื่อ parenchyma ของรากสะสมอาหาร (SRP) ที่อายุ 2 เดือน (2M) 3 เดือน (3M) และ 6 เดือน (6M)

จากผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนข้างต้น ทำให้สามารถคัดเลือกยีนเป้าหมาย ที่มีการแสดงออกสอดคล้องกับการพัฒนาของรากสะสมอาหารของม้นสำปะหลัง แต่เพื่อให้เข้าใจหน้าที่และกลไกการทำงานของยีนเป้าหมายมากขึ้น จึงต้องทำการศึกษาน้ำที่ของยีนเป้าหมายเพิ่มเติมด้วยกระบวนการถ่ายโอนยีนม้นสำปะหลังเป้าหมายทั้งในกลุ่มของยีน *AVPI EXO* และ *MRB1* เข้าสู่พืช เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หน้าที่ของยีนเมื่อมีการกระตุ้นการแสดงออกในพืชว่ามีลักษณะรูปร่าง และขนาดเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากพืชปกติไปอย่างไร โดยเฉพาะขนาดของอวัยวะสะสมอาหารที่สร้างขึ้น ซึ่งจะทำการศึกษการถ่ายโอนยีนเป้าหมายในขั้นตอนถัดไป

4. การสร้างพาหะถ่ายโอนยีน *AVP1 EXO* และ *MRB1* ของมันสำปะหลังเข้าสู่ระบบมันฝรั่ง

ผลการวิเคราะห์กลุ่มยีน *AVP1*, *EXO* และ *MRB1* ในมันสำปะหลังด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ไม่แสดงวิวัฒนาการเพื่อคัดแยกสมาชิกยีนในแต่ละกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับยีนแม่แบบจากพืช *Arabidopsis* ประกอบกับผลการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลัง ทำให้สามารถคัดแยกสมาชิกยีนในแต่ละกลุ่มยีนที่น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาและเจริญเติบโตของรากสะสมอาหาร มาศึกษาต่อถึงหน้าที่ในเชิงลึกของสมาชิกยีนในแต่ละกลุ่มด้วยกระบวนการถ่ายโอนยีน ดังสรุปไว้ใน ตารางที่ 9 กล่าวคือในกลุ่มยีน *AVP1* มีสมาชิกยีนที่ถูกนำไปสู่กระบวนการถ่ายโอนยีน 2 ยีน คือ *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* ในส่วนของกลุ่มยีน *EXO* มีสมาชิกยีนที่ถูกนำไปสู่กระบวนการถ่ายโอนยีน 2 ยีนเช่นกัน คือ *MeEXO1* และ *MeEXO3* ส่วนในกลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มยีน *MRB1* มีเพียงยีน *MeMRB1_1* ที่จะถูกนำไปสู่กระบวนการถ่ายโอนยีน ฉะนั้นจึงใช้ชื่อยีน *MeMRB1_1* เป็น *MeMRB1* เพื่อไม่ให้เกิดความสับสนในการบันทึกผล

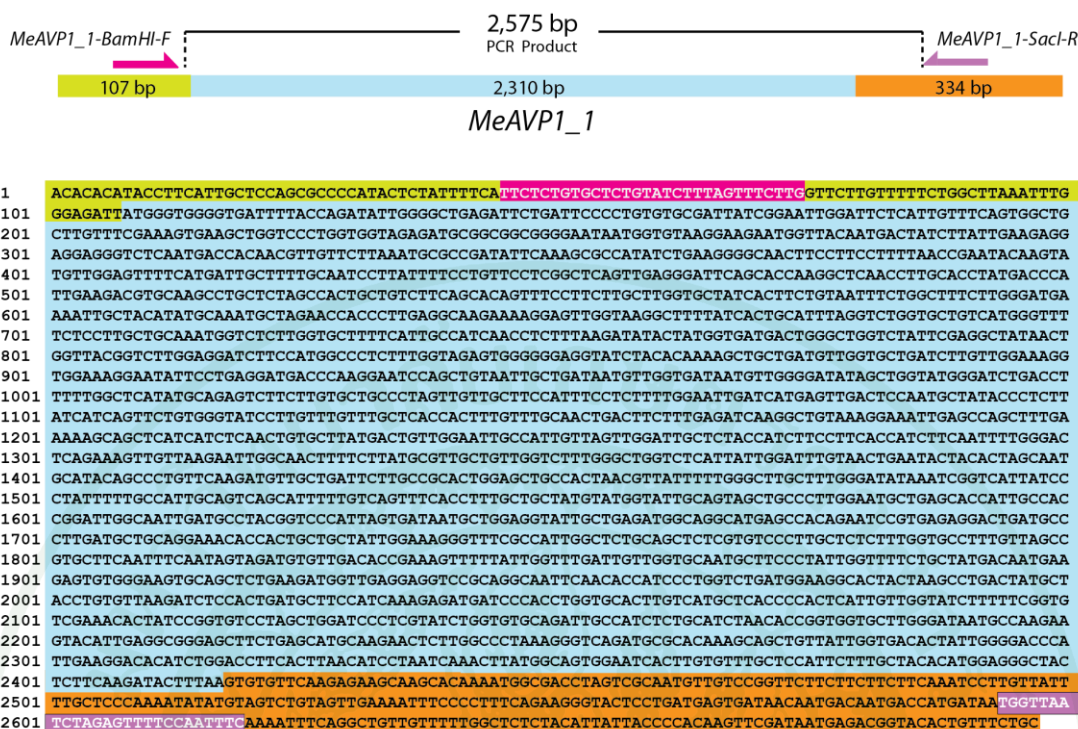
ตารางที่ 9 แสดงสมาชิกยีนของมันสำปะหลังในกลุ่มยีน *AVP1 EXO* และ *MRB* ที่จะถูกนำไปสู่กระบวนการถ่ายโอนยีน

กลุ่มยีนเป้าหมาย	สมาชิกยีนในมันสำปะหลัง ที่ถูกนำไปสู่กระบวนการถ่ายโอนยีน
<i>AVP1</i>	<i>MeAVP1_1</i>
	<i>MeAVP1_2</i>
<i>EXO</i>	<i>MeEXO1</i>
	<i>MeEXO3</i>
<i>MRB1</i>	<i>MeMRB1</i>

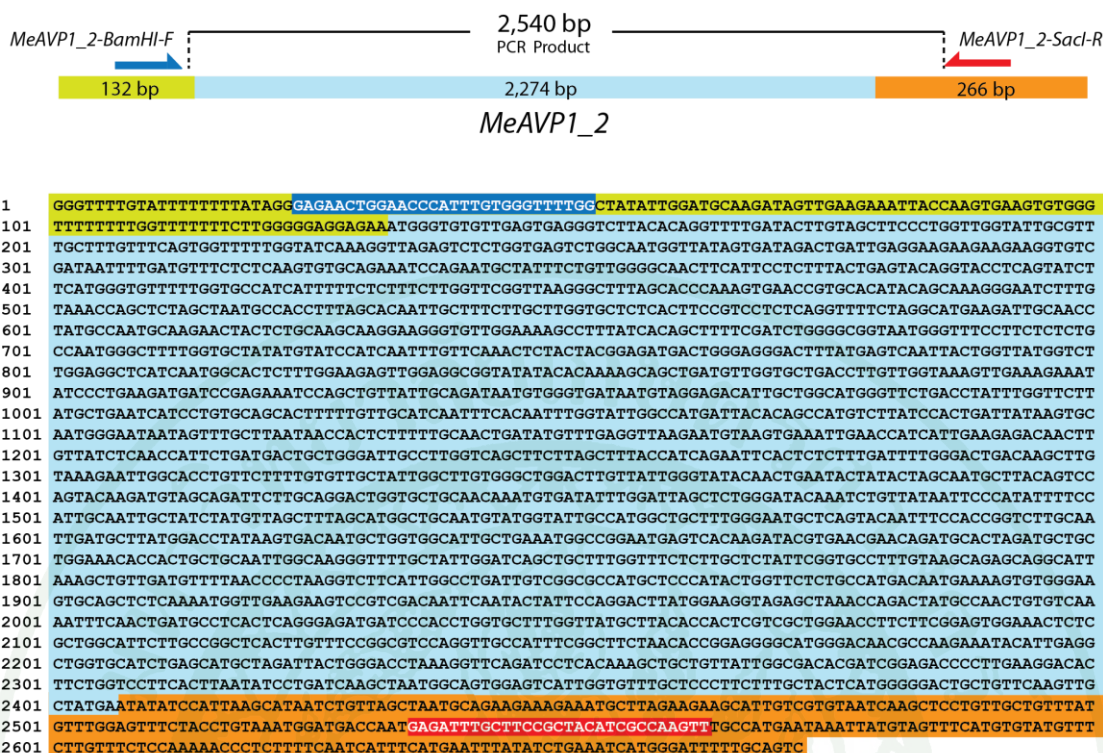
4.1. การสร้างพาหะถ่ายโอนยีนกลุ่ม *AVP1* ของมันสำปะหลัง

จากตารางที่ 9 ได้คัดเลือกยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1* ของมันสำปะหลัง คือยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* ที่น่าจะมีหน้าที่คล้ายคลึงกับยีนแม่แบบ *AtAVP1* และน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันหน้าที่ของยีนดังกล่าว จึงทำการสร้างพาหะถ่ายโอนยีนสำหรับยีนเป้าหมายทั้ง 2 เพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีนทั้ง 2 ในเชิงลึกด้วยการถ่ายโอนยีน เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้โคลนแยกยีน

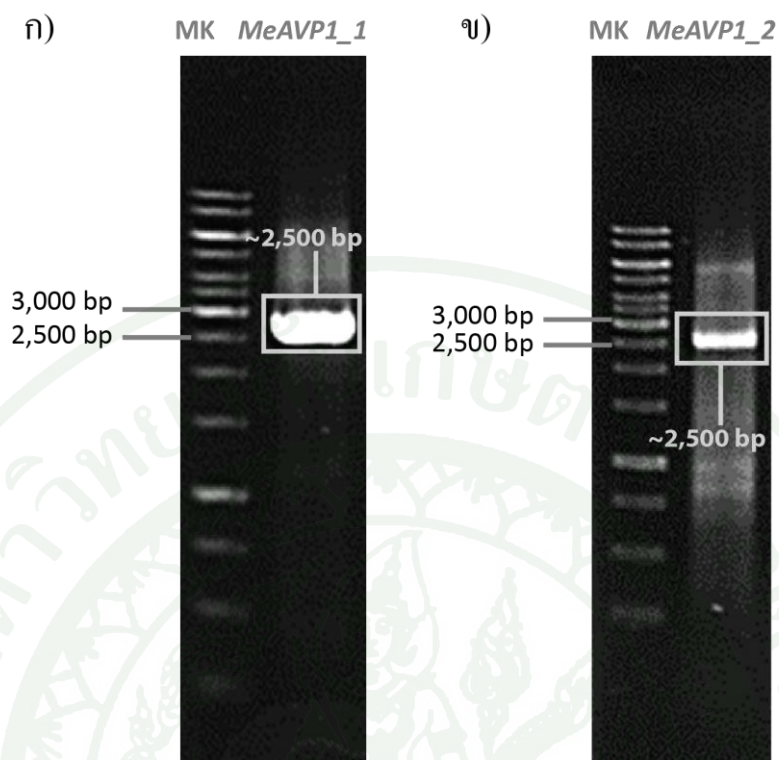
เป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ซึ่งข้อมูลไพรเมอร์ที่ออกแบบได้แสดงใน ตารางที่ 4 การออกแบบไพรเมอร์ต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง และออกแบบไพรเมอร์จำเพาะในบริเวณ UTR (untranslated region) ทั้ง forward และ reverse primer ซึ่งตำแหน่งไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeAVPI_1* และ *MeAVPI_2* ได้แสดงไว้ในภาพที่ 34 และ ภาพที่ 35 ตามลำดับ นำไพรเมอร์ที่ออกแบบแล้วข้างต้นไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่กับ cDNA จากส่วนของอวัยวะของมันสำปะหลังที่ยีนนั้นมีการแสดงออกสูงมาเป็นแม่แบบ ซึ่งทั้งสองยีนมีการแสดงออกสูงที่ รากสะสมอาหารของมันสำปะหลังจึงนำ cDNA ที่สร้างจาก RNA ที่สกัดได้จากรากสะสมอาหารอายุ 3 เดือนมาเป็นแม่แบบ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วยกระบวนการเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 36) โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อนำไปเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 Kb (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) พบว่าในภาพที่ 36 ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตลูกโซ่จากคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *MeAVPI_1* มีขนาดประมาณ 2,500 bp ตรงกับขนาดที่คาดหวังไว้จากการออกแบบไพรเมอร์ และเมื่อพิจารณาภาพที่ 36 พบว่าผลผลิตจากปฏิกิริยา ลูกโซ่ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *MeAVPI_2* มีขนาดประมาณ 2,500 bp ตรงกับขนาดที่คาดหวังไว้เช่นกัน จากผลการวิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสข้างต้น ทำให้ทราบว่าการแยกยีนเป้าหมาย *MeAVPI_1* และ *MeAVPI_2* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นผลสำเร็จ จึงนำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ที่มีขึ้นยีนเป้าหมายไปผ่านกระบวนการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T easy (Promega) และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดดังกล่าวด้วยวิธีการ blue-white colony selection เพื่อใช้คัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์เดียวกันกับไพรเมอร์ที่ใช้โคลนแยกยีนเป้าหมาย (ภาพที่ 37) ผลที่ได้คือยีน *MeAVPI_1* มีโคลนที่มีขนาดตรงกับที่คาดหวังคือ 2,500 จำนวน 9 โคลน และยีน *MeAVPI_2* มีโคลนที่มีขนาดตรงกับที่คาดหวัง จำนวน 1 โคลน จึงทำการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ให้ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ตรงกับขนาดคาดหวังของแต่ละยีนเป้าหมาย มาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากเซลล์แบคทีเรียโคโลนีนั้น เพื่อนำไปสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับยีนในฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลังหรือไม่ ซึ่งโคโลนีที่ได้ทำการคัดเลือกไปทั้ง 2 ยีนมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับยีนเป้าหมายในฐานจีโนมมันสำปะหลังทั้งหมด เป็นการยืนยันว่าโคโลนีของแบคทีเรีย *E. coli* มีการได้รับ ขึ้นยีนเป้าหมายที่ต่อกับพลาสมิด pGEM®-T easy จึงนำโคโลนีดังกล่าวไปเข้าสู่กระบวนการ sub-clone หรือ การถ่ายเปลี่ยนขึ้นยีนเป้าหมายจากพลาสมิด pGEM®-T easy เข้าสู่พาหะถ่ายโอนยีน pBI121 ต่อไป



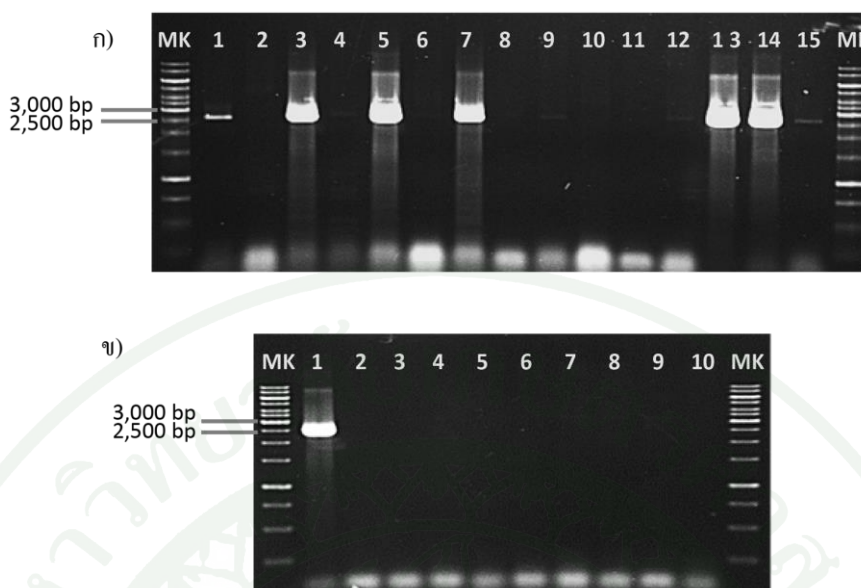
ภาพที่ 34 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeAVP1_1* (cassava4.1_002124m.g) จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_1-BamHI-F และ MeAVP1_1-SacI-R รวมทั้งขนาดที่คาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาถูกลูกโซ่ซึ่งอยู่ที่ 2,575 bp โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_1-BamHI-F ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีชมพู และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_1-SacI-R ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีม่วง ส่วนกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวแสดงบริเวณที่เป็น 5' UTR ของยีน กรอบสี่เหลี่ยมฟ้าแสดงบริเวณยีนที่จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงแสดงบริเวณที่เป็น 3'UTR ของยีน ซึ่งระบุความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวที่ 107 bp 2,310 bp และ 334 bp ตามลำดับ



ภาพที่ 35 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeAVP1_2* (cassava4.1_002160m.g) จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_2-BamHI-F และ MeAVP1_2-SacI-R รวมทั้งขนาดที่คาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ซึ่งอยู่ที่ 2,540 bp โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_2-BamHI-F แสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีน้ำเงิน และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeAVP1_2-SacI-R แสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีแดง ส่วนกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวแสดงบริเวณที่เป็น 5' UTR ของยีน กรอบสีฟ้าแสดงบริเวณยีนที่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และกรอบสีส้มแสดงบริเวณที่เป็น 3'UTR ของยีน ซึ่งระบุความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวที่ 132 bp 2,274 bp และ 266 bp ตามลำดับ



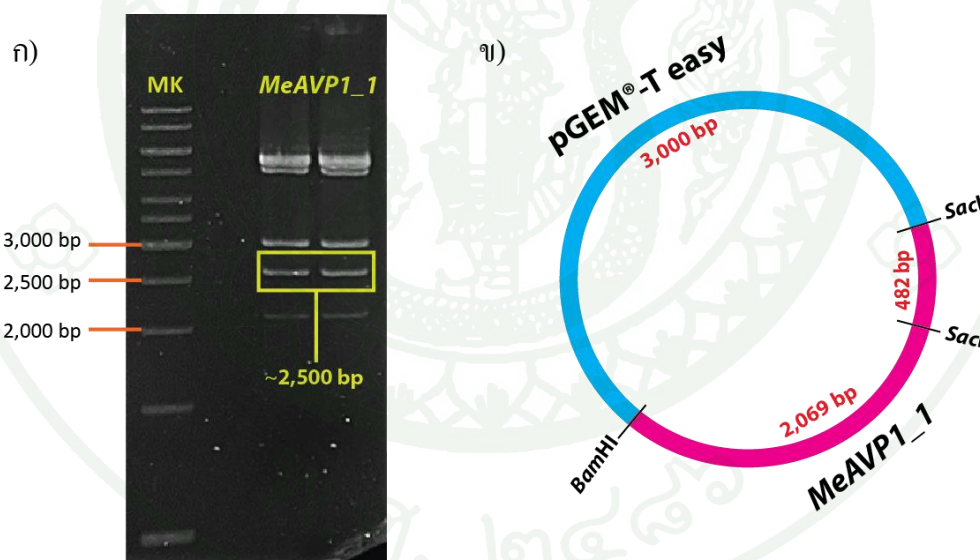
ภาพที่ 36 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ ที่ได้จากการแยก แลบดีเอ็นเอของยีน *MeAVP1_1* (ก) และ *MeAVP1_2* (ข) ด้วยคู่มือไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่กับแลบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ยีน อยู่ที่ประมาณ 2,500 bp



ภาพที่ 37 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ที่ได้จากกรรมวิธี colony PCR ของยีน *MeAVP1_1* (ก) จำนวน 15 โคลน และ *MeAVP1_2* (ข) จำนวน 10 โคลน ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ยีนอยู่ที่ประมาณ 2,500 bp

หลังจากผ่านกระบวนการยืนยันการมีอยู่ของยีนในโคลนเป้าหมายของทั้ง 2 ยีน ด้วยวิธี colony PCR และการสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำการนำพลาสมิดของทั้ง 2 ยีน มาถ่ายเปลี่ยนขึ้นยีนเป้าหมาย เข้าสู่พาหะถ่ายโอนยีน pBI121 โดยทำการตัดชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายออกจากพลาสมิด pGEM®-T easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I (ภาพที่ 38 และภาพที่ 39) ซึ่งในส่วนของยีน *MeAVP1_1* จะมีจุดตัดเอนไซม์ *Sac*I อยู่ภายในยีนตามที่แสดงในภาพที่ 38x ทำให้ต้องตัดด้วยสภาวะไม่สมบูรณ์ของเอนไซม์ (partial digestion) ส่วนยีน *MeAVP1_2* สามารถตัดสมบูรณ์ได้ตามปกติ ทำการตัดและสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดตรงกับขนาดคาดหวังของแต่ละยีนคืออยู่ที่ประมาณ 2,500 bp และนำไปสู่ปฏิกิริยาเชื่อมต่อเข้ากับโครงสร้างของพลาสมิด pBI121 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I เช่นกัน ซึ่งจะทำให้การแสดงออกของยีนเป้าหมาย อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35S ที่จะทำให้มีการแสดงออกของยีนในปริมาณสูง และภายใต้โปรโมเตอร์ *patatin* ที่จะควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายให้มีความจำเพาะต่อส่วนอวัยวะสะสมอาหารของพืช ทั้งนี้พลาสมิดที่ได้จะถูกนำไปชักนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวนและทำการตรวจสอบโดยการทำ colony PCR จากนั้นทำการ

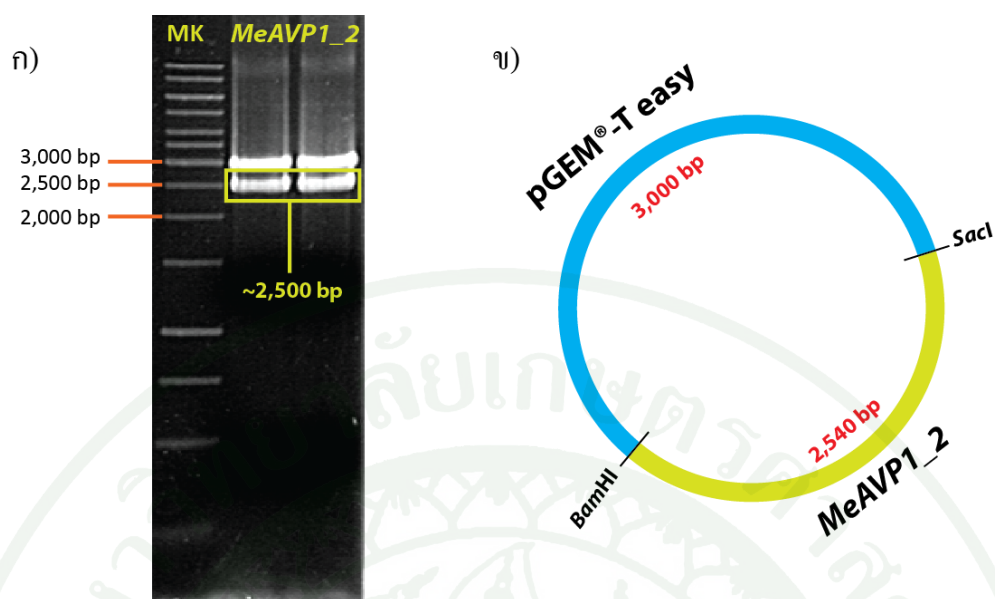
คัดเลือกโคลนที่ให้ผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ที่ตรงกับขนาดคาดหวังมาสกัดพลาสมิด และชักนำสู่กระบวนการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่ *Agrobacterium* เมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าวเรียบร้อยแล้วจะทำการตรวจสอบโคโลนีของ *Agrobacterium* ด้วยกรรมวิธี colony PCR จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ที่ตรงกับขนาดคาดหวังมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอส่งไปสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายที่อยู่ใน *Agrobacterium* นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลนที่ผ่านการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายภายในเซลล์ *Agrobacterium* ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์อีกครั้ง (ภาพที่ 40) ซึ่งจากผลดังกล่าวจะเห็นว่าโคลนของ *Agrobacterium* ที่เลือกมาทั้งหมดให้ผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ที่ตรงกับขนาดคาดหวังของยีนเป้าหมายคืออยู่ที่ประมาณ 2,500 bp ดังนั้นจึงคัดเลือกโคลนของแต่ละยีนเพียง 1 โคลนเท่านั้น เพื่อนำเข้าสู่กระบวนการชักนำ *Agrobacterium* ให้เกิดการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดที่มียีนเป้าหมายเข้าสู่พืช หลังจากนั้นเมื่อได้ต้น putative transgenic ของยีนเป้าหมาย จะเข้าสู่ขั้นตอนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายในพืชมันฝรั่งต่อไป



ภาพที่ 38 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน *MeAVP1_1*

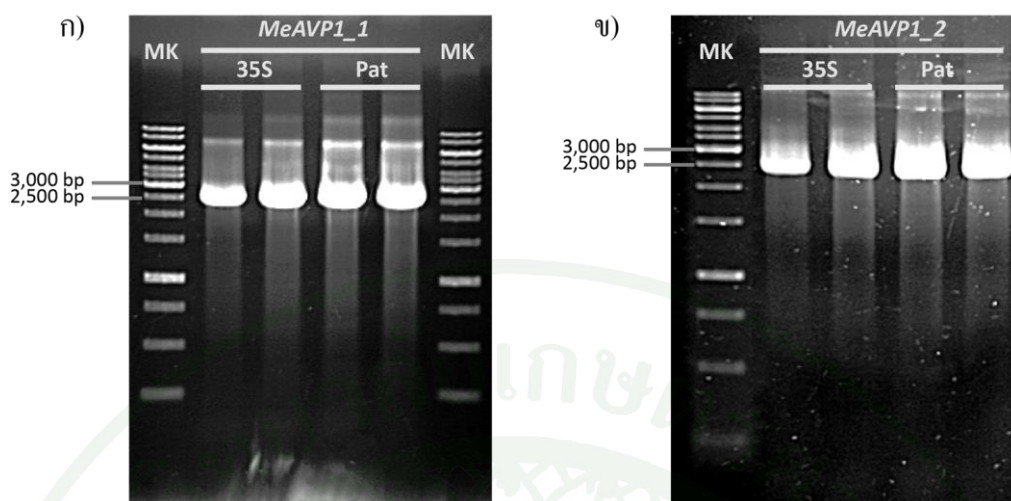
ก) ภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I ของยีน *MeAVP1_1* แบบไม่สมบูรณ์ เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของยีนอยู่ที่ประมาณ 2,500 bp

ข) แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I บนพลาสมิด pGEM[®]-T easy (เส้นสีฟ้า) ที่ต่อกับยีน *MeAVP1_1* (เส้นสีชมพู)



ภาพที่ 39 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน *MeAVP1_2*

- ก) ภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I ของยีน *MeAVP1_2* เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของยีนอยู่ที่ประมาณ 2,500 bp
- ข) แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I บนพลาสมิด pGEM®-T easy (เส้นสีฟ้า) ที่ต่อกับยีน *MeAVP1_2* (เส้นสีเขียว)



ภาพที่ 40 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากพลาสมิดของ *Agrobacterium* ที่มียีนเป้าหมาย *MeAVP1_1* (ก) และ *MeAVP1_2* (ข) เชื่อมต่อกับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S และ patatin (Pat) เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ยีน อยู่ที่ประมาณ 2,500 bp

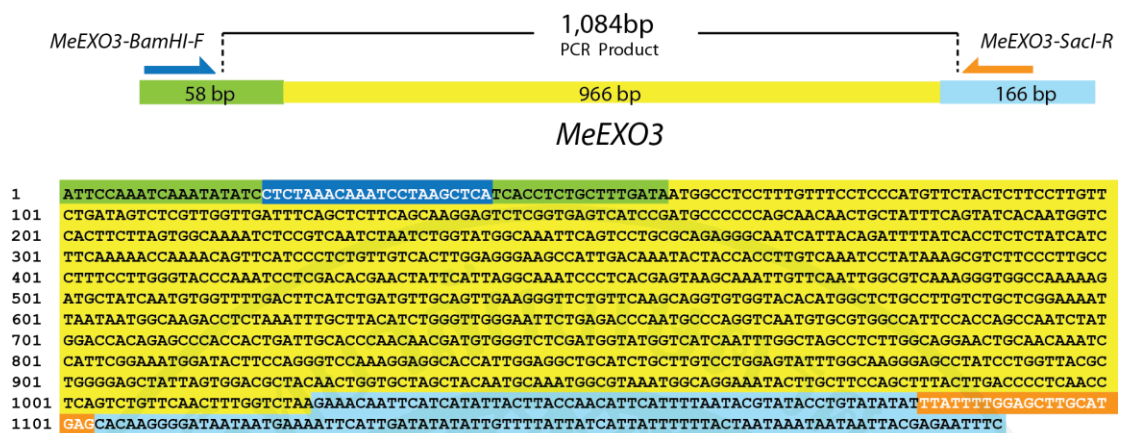
4.2. การสร้างพาหะถ่ายโอนยีนกลุ่ม *EXO* ของมันสำปะหลัง

จากการคัดเลือกยีนด้วยการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการร่วมกับการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของกลุ่มยีน *EXO* ในมันสำปะหลัง ทำให้สามารถคัดเลือกยีน *EXO* ในมันสำปะหลังได้จำนวน 2 ยีน (ตารางที่ 9) คือยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* เพื่อนำไปสร้างพาหะถ่ายโอนยีน pBI121 ที่ใช้ในการถ่ายโอนยีนเป้าหมายฝรั่ง โดยขั้นตอนการสร้างพาหะถ่ายโอนยีนจะดำเนินการเหมือนกลุ่มยีน *AVP1* ซึ่งจะเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้โคลนแยกยีนเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ การออกแบบจะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากฐานข้อมูลสำปะหลัง โดยตำแหน่งไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน มีดังที่แสดงอยู่ในภาพที่ 41 และ ภาพที่ 42 ซึ่งขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ที่คาดหวังไว้จากการออกแบบไพรเมอร์ยีน *MeEXO1* จะอยู่ที่ 1,061 bp และยีน *MeEXO3* อยู่ที่ 1,084 bp ทำการโคลนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ด้วยไพรเมอร์คู่ดังกล่าวโดยใช้ cDNA ที่มาจากเนื้อเยื่อที่มีระดับการแสดงออกของยีนสูง ในที่นี้เลือกส่วนของรากสะสมอาหารอายุ 3 เดือนมาใช้ในกระบวนการโคลนยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* เมื่อตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ (ภาพที่ 43) พบว่าผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่ของทั้ง 2 ยีน เมื่อเทียบแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb แล้ว มีขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่

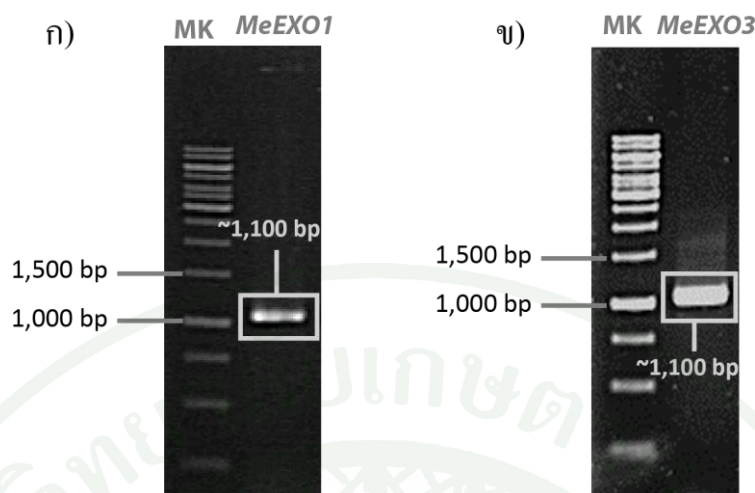
ประมาณ 1,100 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังไว้ ดังนั้นจึงทำการเชื่อมต่อผลผลิตปฏิกิริยาถูกลูโซ่ที่ได้เข้ากับพลาสมิด pGEM®-T easy และถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวนและคัดเลือกลำดับที่ตรงตามที่ต้องการ ทำการคัดเลือกโคลนที่ให้ผล colony PCR และผลการสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับยีนเป้าหมายทั้ง 2 ยีน นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อเตรียมเข้าสู่กระบวนการ sub-clone หรือ การถ่ายเปลี่ยนยีนเป้าหมายจากพลาสมิด pGEM®-T easy เข้าสู่พาหะถ่ายโอนยีน pBI121



ภาพที่ 41 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeEXO1* (cassava4.1_012048m.g) จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeEXO1-BamHI-F และ MeEXO1-SacI-R รวมทั้งขนาดที่คาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาถูกลูโซ่ซึ่งอยู่ที่ 1,061 bp โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ MeEXO1-BamHI-F ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสีเหลี่ยมสีแดง และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeEXO1-SacI-R ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสีเหลี่ยมสีม่วง ส่วนกรอบสีเหลี่ยมสีเขียวแสดงบริเวณที่เป็น 5' UTR ของยีน กรอบสีเหลืองแสดงบริเวณยีนที่จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และกรอบสีฟ้าแสดงบริเวณที่เป็น 3' UTR ของยีน ซึ่งระบุความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวที่ 78 bp 957 bp และ 188 bp ตามลำดับ



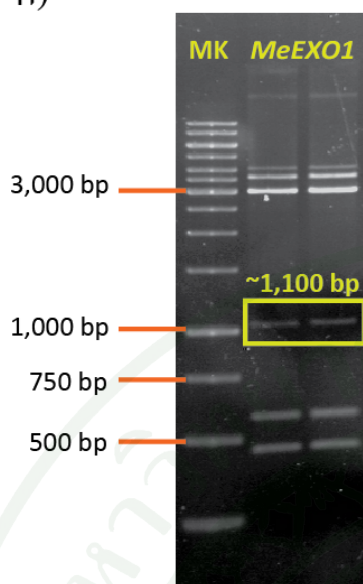
ภาพที่ 42 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeEXO3* (cassava4.1_011938m.g) จากฐานข้อมูล จีโนมมันสำปะหลัง และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeEXO3-BamHI-F และ MeEXO3-SacI-R รวมทั้งขนาดที่คาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ซึ่งอยู่ที่ 1,084 bp โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ MeEXO3-BamHI-F ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีน้ำเงิน และตำแหน่งของไพรเมอร์ MeEXO3-SacI-R ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีส้ม ส่วนกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวแสดงบริเวณที่เป็น 5' UTR ของยีน กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณยีนที่จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และกรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่เป็น 3'UTR ของยีน ซึ่งระบุความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวที่ 58 bp 966 bp และ 166 bp ตามลำดับ



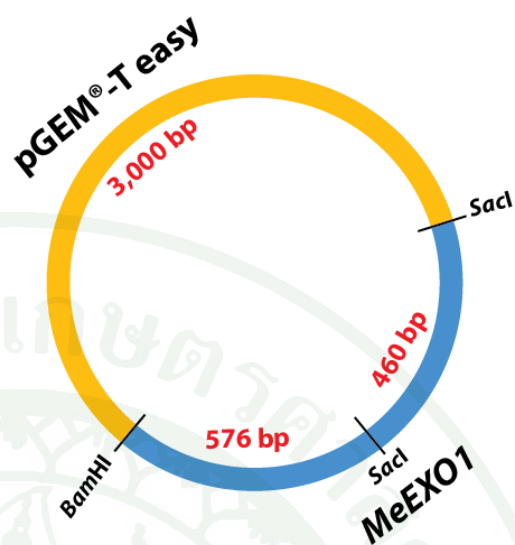
ภาพที่ 43 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอร์ ที่ได้จากการแยกแถบดีเอ็นเอของยีน *MeEXO1* (ก) และ *MeEXO3* (ข) ด้วยคู่มือไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาถูกลูโซกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ยีน อยู่ที่ประมาณ 1,100 bp

เมื่อได้พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลนที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่ามียีนเป้าหมาย *MeEXO1* และ *MeEXO3* บรรจุอยู่ทำการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อทำการย้ายชิ้นยีนเป้าหมายจากพลาสมิด pGEM®-T easy ไปเชื่อมต่อเข้ากับโครงสร้างของพลาสมิด pBI121 โดยผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้แสดงเอาไว้ในภาพที่ 44 และภาพที่ 45 ซึ่งในส่วนของยีน *MeEXO1* (ภาพที่ 44) เมื่อผ่านกระบวนการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I แล้วพบว่ามียีนหลายขนาด เนื่องจากภายในส่วนของยีนเป้าหมายมีตำแหน่งตัดเอนไซม์ *Sac*I อยู่ (ภาพที่ 44ข) จึงต้องอาศัยกระบวนการตัดแบบไม่สมบูรณ์เพื่อให้ได้ชิ้นยีนเป้าหมายตามขนาดที่ต้องการ คือแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,100 bp ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับที่คาดหวังในยีน *MeEXO3* เช่นกัน โดยในกรณีของยีน *MeEXO3* สามารถตัดด้วยเอนไซม์แบบสมบูรณ์ได้ปกติจึงให้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 3,000 bp หนึ่งแถบซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิด pGEM®-T easy และแถบของยีนเป้าหมายตามขนาดคาดหวังที่ 1,100 bp (ภาพที่ 45) ทำการตัดและสกัดดีเอ็นเอจากเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อนำไปสู่ปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ทั้งสองชนิด คือโครงสร้างพลาสมิดที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S และ *patatin* เพื่อใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายให้แสดงออกในระดับสูง และให้แสดงออกจำเพาะต่อส่วนอวัยวะสะสมอาหารตามลำดับ

ก)



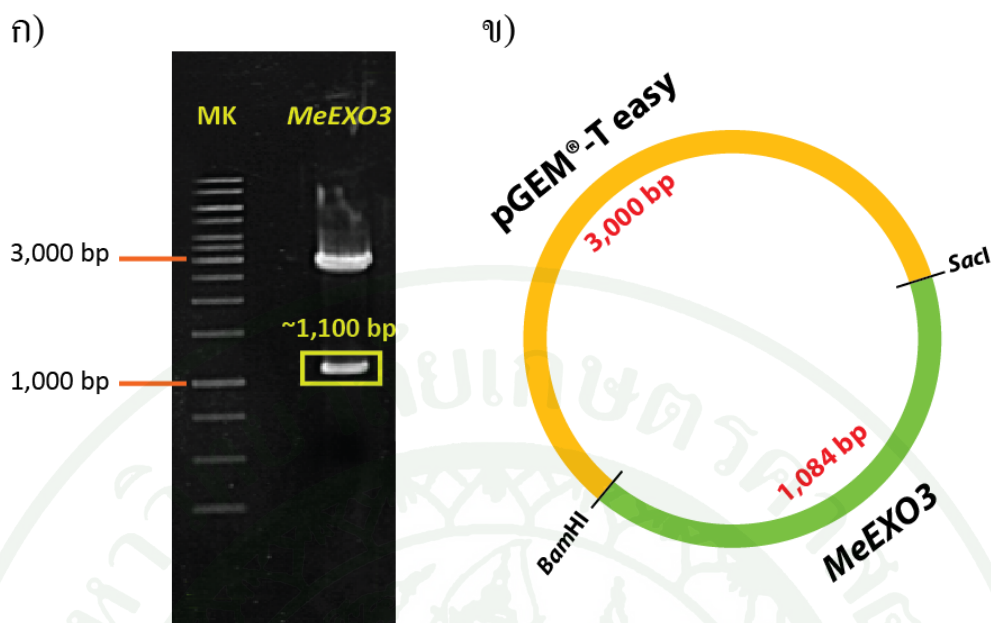
ข)



ภาพที่ 44 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน *MeEXO1*

ก) ภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I ของยีน *MeEXO1* แบบไม่สมบูรณ์ เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของยีนอยู่ที่ประมาณ 1,100 bp

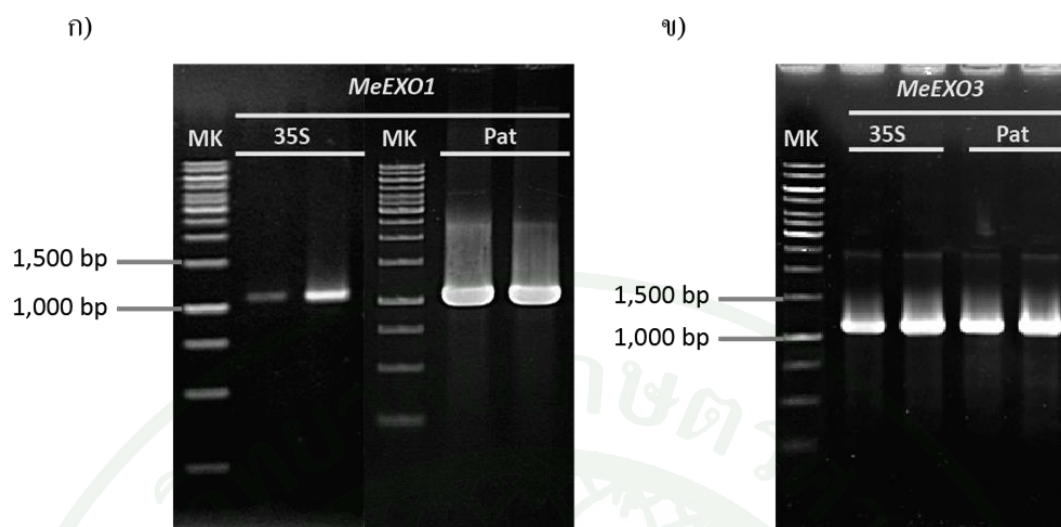
ข) แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I บนพลาสมิด pGEM®-T easy (เส้นสีเหลือง) ที่ต่อยกับยีน *MeEXO1* (เส้นสีฟ้า)



ภาพที่ 45 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน *MeEXO3*

- ก) ภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I ของยีน *MeEXO3* เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของยีนอยู่ที่ประมาณ 1,100 bp
- ข) แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I บนพลาสมิด pGEM®-T easy (เส้นสีเหลือง) ที่ต่อกับยีน *MeEXO3* (เส้นสีเขียว)

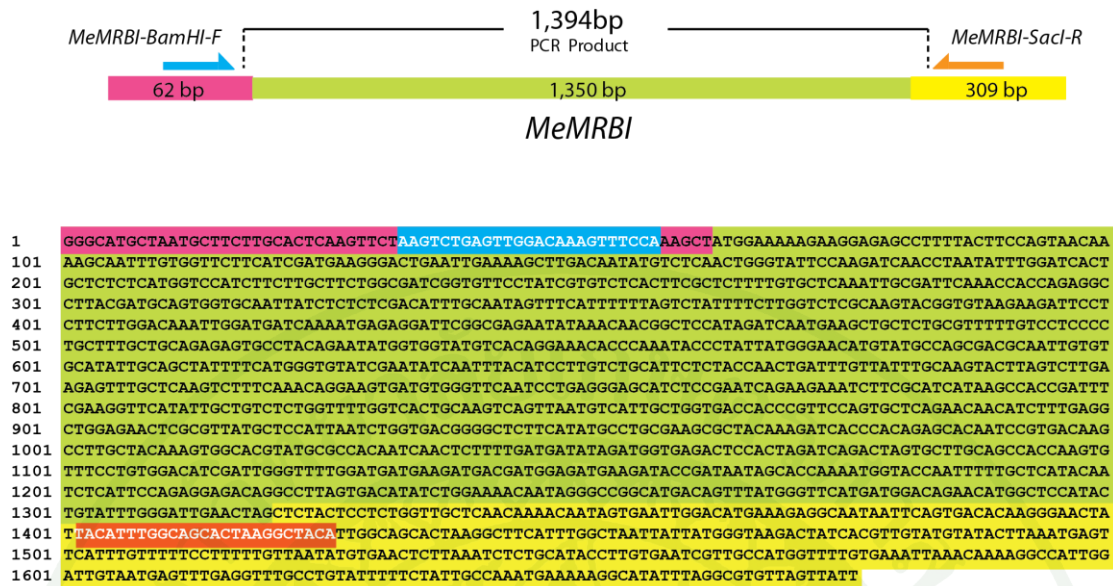
จากนั้นนำโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ที่ผ่านกระบวนการเชื่อมต่อกับยีนเป้าหมาย *MeEXO1* และ *MeEXO3* เข้าสู่กระบวนการถ่ายโอนและคัดเลือกโคลนที่ได้รับโครงสร้างพลาสมิดที่มียีนเป้าหมายภายในแบคทีเรีย *E. coli* นำโคลนจากแบคทีเรียที่มียีนเป้าหมายมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อถ่ายโอนเข้าสู่ *Agrobacterium* โดยเมื่อถ่ายโอนเสร็จเรียบร้อยแล้วทำการคัดเลือกโคลนของ *Agrobacterium* ด้วยวิธี colony PCR เพื่อหาโคลนที่มียีนเป้าหมาย และตรวจสอบจากพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่อีกครั้งหนึ่ง (ภาพที่ 46) จากผลการตรวจสอบโครงสร้างพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือก จะเห็นว่าโคลนที่คัดเลือกของ *MeEXO1* และ *MeEXO3* ทุกโคลนมีผลผลิตจากปฏิกิริยา ลูกโซ่ขนาดใกล้เคียงกับขนาดคาดหวังที่ประมาณ 1,100 bp ดังนั้นคัดเลือกเพียงโครงสร้างพลาสมิดละ 1 โคลน เพื่อนำเข้าสู่กระบวนการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดผ่านเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium* เข้าสู่พืช และรอการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายในพืชที่ชักนำได้หลังการถ่ายโอนยีนต่อไป



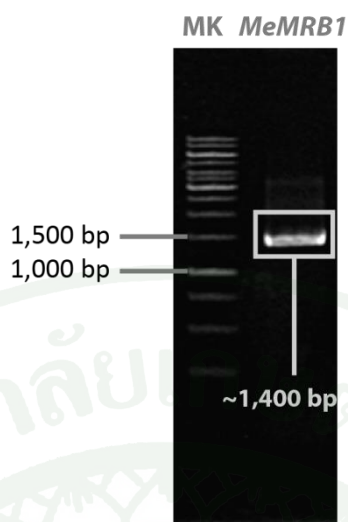
ภาพที่ 46 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากพลาสมิดของ *Agrobacterium* ที่มีชิ้นเป้าหมาย *MeEXO1* (ก) และ *MeEXO3* (ข) เชื่อมต่อกับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S และ patatin (Pat) ทำการเปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ชิ้น อยู่ที่ประมาณ 1,100 bp

4.3. การสร้างพาหะถ่ายโอนยีนกลุ่ม *MRB1* ของมันสำปะหลัง เข้าสู่ระบบมันฝรั่ง

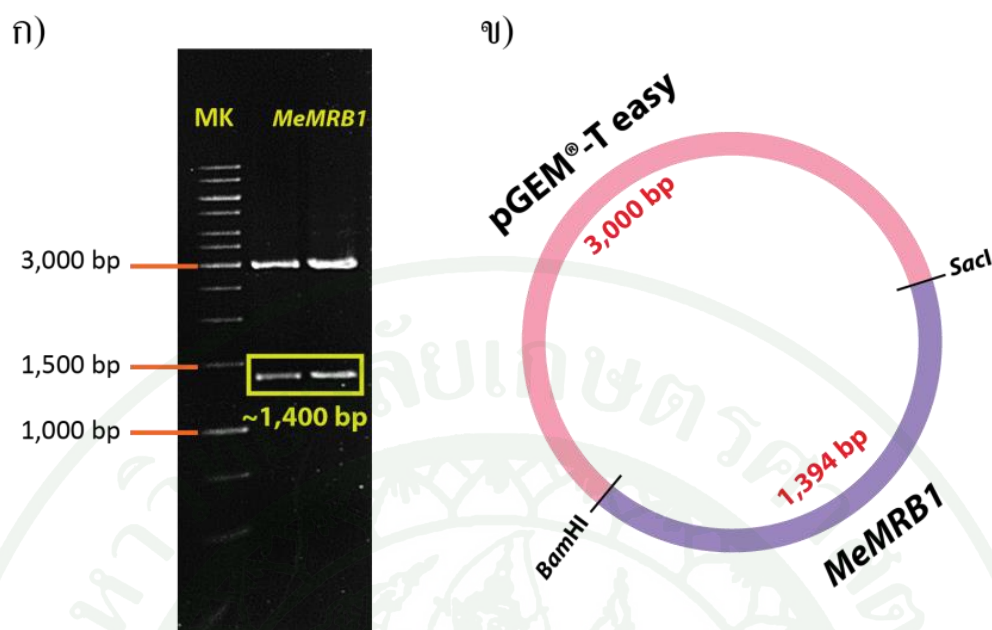
จากตารางที่ 9 แสดงผลการคัดเลือกยีนกลุ่ม *MRB1* ของมันสำปะหลังด้วยกระบวนการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีน และการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการ ซึ่งทำให้สามารถคัดเลือกยีนกลุ่ม *MRB1* ของมันสำปะหลัง เหลือเพียง 1 ยีนเท่านั้นที่น่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาสร้างของรากสะสมอาหาร คือยีน *MeMRB1* ดังนั้นจึงนำยีนดังกล่าวเข้าสู่กระบวนการสร้างพาหะถ่ายโอนยีน โดยวิธีการดำเนินการจะเหมือนกันกับที่อธิบายเอาไว้ในส่วนของกลุ่มยีน *AVP1* และ *EXO* เริ่มจากกระบวนการโคลนแยกยีนเป้าหมาย ซึ่งจะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeMRB1* จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง มาออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีนเป้าหมาย เพื่อทำการโคลนแยกยีน (ภาพที่ 47) ซึ่งขนาดคาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ตามที่ได้ออกแบบไว้อยู่ที่ 1,394 bp นำไพรเมอร์คู่ดังกล่าวเข้าสู่ปฏิกิริยาถูกโซ่โดยใช้ cDNA ที่ได้จากรากสะสมอาหารอายุ 3 เดือนมาเป็นดีเอ็นเอสายต้นแบบของปฏิกิริยาถูกโซ่ เมื่อนำผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ไปตรวจสอบผลด้วยวิธีการเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 48) พบว่าผลผลิตที่ได้มีขนาดตรงกับขนาดคาดหวังคืออยู่ที่ประมาณ 1,400 bp จากนั้นจึงนำผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่เข้าสู่ปฏิกิริยาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T easy เพื่อนำไปถ่ายโอนเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย *E. coli* เมื่อผ่านกระบวนการถ่ายโอนเรียบร้อยแล้ว ทำการคัดเลือกโคลนของแบคทีเรียที่มีการรับพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับยีน *MeMRB1* ด้วยกรรมวิธี colony PCR และทำการยืนยันผลความถูกต้องอีกครั้งด้วยการนำไปสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากพลาสมิดดีเอ็นเอของโคลนที่คัดเลือกดังกล่าว เมื่อสามารถยืนยันโคลนที่มียีนเป้าหมาย *MeMRB1* ถูกต้องเรียบร้อยแล้ว นำมาเข้าสู่กระบวนการถ่ายเปลี่ยนยีนเป้าหมายเข้าสู่โครงสร้างพลาสมิด pBI121 ทั้งแบบที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S และ patatin โดยจะใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลนที่คัดเลือกมาผ่านกระบวนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อแยกยีนเป้าหมายออกจากพลาสมิด pGEM[®]-T easy (ภาพที่ 49) จากผลสามารถเห็นแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด ซึ่งในแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 3,000 bp คือขนาดของพลาสมิด pGEM[®]-T easy ส่วนแถบดีเอ็นเออีกแถบหนึ่งซึ่งมีขนาดประมาณ 1,400 bp เป็นแถบดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย *MeMRB1* ที่ได้จากการตัดแยกด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I ทำการตัดและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล บริเวณที่มียีนเป้าหมาย เพื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อกับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ทั้ง 2 แบบ เพื่อเตรียมถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium*



ภาพที่ 47 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MeMRB1* (cassava4.1_007974m.g) จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง และตำแหน่งของไพรเมอร์ *MeMRB1-BamHI-F* และ *MeMRB1-SacI-R* รวมทั้งขนาดที่คาดหวังของผลผลิตปฏิกิริยาดีเอ็นเอซึ่งอยู่ที่ 1,394 bp โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ *MeMRB1-BamHI-F* ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีฟ้า และตำแหน่งของไพรเมอร์ *MeMRB1-SacI-R* ถูกแสดงด้วยลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมสีส้ม ส่วนกรอบสี่เหลี่ยมสีชมพูแสดงบริเวณที่เป็น 5' UTR ของยีน กรอบสีเขียวแสดงบริเวณยีนที่จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และกรอบสีเหลืองแสดงบริเวณที่เป็น 3'UTR ของยีน ซึ่งระบุความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวที่ 62 bp 1,350 bp และ 309 bp ตามลำดับ



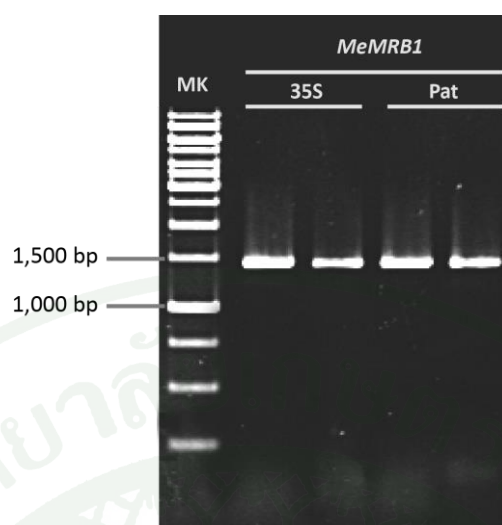
ภาพที่ 48 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาหลูโซพอลิเมอร์ส ที่ได้จากการแยกยีน *MeMRB1* ด้วยคู่มือที่ออกแบบจำเพาะกับยีน เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาหลูโซกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของทั้ง 2 ยีน อยู่ที่ประมาณ 1,400 bp



ภาพที่ 49 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน *MeMRB1*

- ก) ภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I ของยีน *MeMRB1* เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังของยีนอยู่ที่ประมาณ 1,400 bp
- ข) แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I บนพลาสมิด pGEM®-T easy (เส้นสีชมพู) ที่ต่อกับยีน *MeMRB1* (เส้นสีม่วง)

เมื่อเชื่อมต่อยีนเป้าหมายเข้ากับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ทั้งที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S และ Patatin เรียบร้อยแล้ว นำโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่กระบวนการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่ *Agrobacterium* และตรวจสอบโคลนที่ได้รับการถ่ายโอนด้วยวิธี colony PCR เมื่อสามารถคัดเลือกโคลนเป้าหมายที่น่าจะมียีนเป้าหมายแล้ว ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลนดังกล่าวจากนั้นนำมาตรวจสอบอีกครั้งด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซ่ โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอสายต้นแบบ (ภาพที่ 50) ซึ่งผลที่ได้จะเห็นว่าเมื่อเทียบแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 1 kb แถบดีเอ็นเอจากโคลนที่เลือกมาทั้งหมดมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 bp ซึ่งมีขนาดตรงกับขนาดคาดหวังของไพรเมอร์ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกโคลนของแต่ละโครงสร้างพลาสมิดมาเพียง 1 โคลน เพื่อนำเข้าสู่กระบวนการชักนำ *Agrobacterium* ให้เกิดการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่พืชมันฝรั่ง และรอเข้าสู่กระบวนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายในพืชมันฝรั่งต่อไป



ภาพที่ 50 แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์สที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากพลาสมิดของ *Agrobacterium* ที่มีชิ้นเป้าหมาย *MeMRB1* เชื่อมต่อกับโครงสร้างพลาสมิด pBI121 ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S และ patatin (Pat) เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่ด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดที่คาดหวังอยู่ที่ประมาณ 1,400 bp

5. การถ่ายยีนมันสำปะหลังเป้าหมายเข้าสู่มันฝรั่ง

5.1. การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายในต้นมันฝรั่งคัดแปลงพันธุกรรม

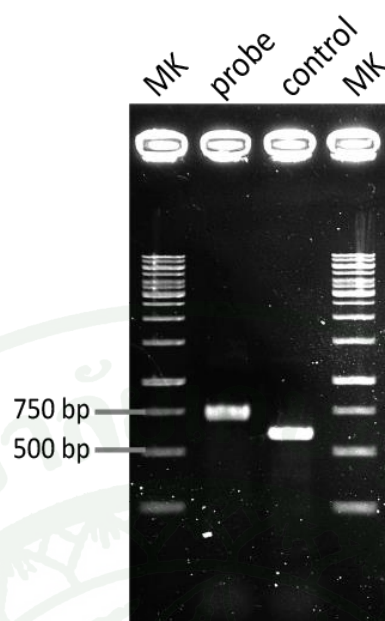
ถึงแม้ว่ารากสะสมอาหาร และหัวของมันฝรั่ง พัฒนามาจากอวัยวะพืชคนละส่วนกัน แต่มีกลไกการพัฒนาอวัยวะเพื่อสะสมอาหารเช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่ามีกลไกในการเกิด และเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน (Ku *et al.*, 2008) ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนมันสำปะหลังสามารถศึกษาโดยใช้มันฝรั่งเป็นพืชแม่แบบ เนื่องจากมันฝรั่งมีการพัฒนารวมวิธีการถ่ายโอนยีนที่ทำได้ง่ายกว่า และใช้เวลาน้อยกว่ามันสำปะหลัง ทำให้การถ่ายโอนยีนเป้าหมายเข้าสู่มันฝรั่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า ดังนั้นมันฝรั่งจึงถูกเลือกให้เป็นพืชแม่แบบในการศึกษาหน้าที่ของยีนกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* จากมันสำปะหลังในการศึกษานี้

ตารางที่ 10 แสดงโครงสร้างพลาสมิดทั้งหมดของกลุ่มยีนเป้าหมาย *MeAVP1*, *MeEXO* และ *MeMRB1* ที่ถ่ายโอนเข้าสู่มันฝรั่ง

ยีน	โครงสร้างพลาสมิด	รหัสโครงสร้างพลาสมิด
<i>MeAVP1_1</i>	pBI121:35S:: <i>MeAVP1_1</i>	AQ-1
	pBI121:pat:: <i>MeAVP1_1</i>	AQ-2
<i>MeAVP1_2</i>	pBI121:35S:: <i>MeAVP1_2</i>	AK-1
	pBI121:pat:: <i>MeAVP1_2</i>	AK-2
<i>MeEXO1</i>	pBI121:35S:: <i>MeEXO1</i>	AR-1
	pBI121:pat:: <i>MeEXO1</i>	AR-2
<i>MeEXO3</i>	pBI121:35S:: <i>MeEXO3</i>	AL-1
	pBI121:pat:: <i>MeEXO3</i>	AL-2
<i>MeMRB1</i>	pBI121:35S:: <i>MeMRB1</i>	AM-1
	pBI121:pat:: <i>MeMRB1</i>	AM-2

เมื่อผ่านกระบวนการถ่ายโอนยีนเป้าหมายเข้าสู่มันฝรั่ง จนพัฒนาได้ต้น putative transgenic แล้ว กระบวนการต่อไปเป็นการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์โดยใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากใบของ putative transgenic เป็นดีเอ็นเอสายแม่แบบ การตรวจสอบ putative transgenic จะใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ (ตารางที่ 5) ซึ่งคู่ที่หนึ่งจะออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณส่วนต้นของโครงสร้างพลาสมิด คือบริเวณปลายของ Nos โปรโมเตอร์ ส่วนต้นของยีน *nptII* และอีกคู่หนึ่งจะออกแบบให้จำเพาะกับส่วนปลายของโครงสร้างพลาสมิดคือบริเวณท้ายของยีนเป้าหมาย ส่วนต้นของ Nos terminator (ภาพที่ 16) โดยการเปรียบเทียบผลจะเทียบเคียงกับผลปฏิกิริยาลูกโซ่ของ positive control negative control และ ผลปฏิกิริยาลูกโซ่จากดีเอ็นเอของมันฝรั่งที่ไม่ได้ถูกถ่ายโอนยีน (wild-type) เพื่อยืนยันว่าผลที่ได้ไม่ได้เกิดมาจากกระบวนการเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ผิดพลาด และไม่มีโครงสร้างพลาสมิดปะปนอยู่ในมันฝรั่งที่ไม่ได้ถูกถ่ายโอนยีน ซึ่งโครงสร้างพลาสมิดสายผสมของยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* ที่ถ่ายโอนเข้าสู่มันฝรั่งมีทั้งหมด 7 โครงสร้างพลาสมิดตามที่แสดงในตารางที่ 10 ทั้งนี้ได้กำหนดรหัสของโครงสร้างพลาสมิดขึ้นใหม่เพื่อให้สะดวกต่อการจดบันทึกผล

ต้น transgenic ที่ผ่านการยืนยันด้วยผลปฏิกิริยาลูกโซ่แล้ว จะถูกนำไปตรวจสอบวิเคราะห์จำนวนชุดของยีนเป้าหมายที่แทรกอยู่ภายในจีโนมของต้น transgenic ด้วยวิธี Southern blot โดยอาศัยการติดตามโครงสร้างพลาสมิดที่มียีนเป้าหมายโดยใช้ดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลาก (probe) ด้วยสาร Digoxigenin (DIG) ที่สร้างด้วยชุด PCR DIG Probe Synthesis (Roche) ผลการสร้างดีเอ็นเอติดฉลากได้แสดงตามภาพที่ 51 ซึ่งดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลากจะมีการเคลื่อนที่ในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสช้ากว่าดีเอ็นเอปกติ เนื่องจากมีโมเลกุลของ DIG เกาะอยู่บนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลาก ทำให้น้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอติดฉลากมีน้ำหนักมากขึ้นจึงเคลื่อนที่ได้ช้าลง เมื่อตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสจึงพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลากอยู่สูงกว่าดีเอ็นเอปกติ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอถูกติดฉลากอยู่จริง จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลากแล้วเข้าสู่กระบวนการติดตามดีเอ็นเอเป้าหมายในขั้นตอนของ Southern blot ต่อไป นอกจากนี้ในต้น transgenic ที่ผ่านการตรวจสอบยืนยันการมีอยู่ของยีนแล้ว จะต้องผ่านการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป้าหมายในต้น transgenic ด้วยวิธีการ semi-quantitative RT-PCR เพื่อเป็นการยืนยันว่ามีการแทรกและการแสดงออกของยีนในต้น transgenic อยู่จริง



ภาพที่ 51 แสดงผลเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการติดฉลากดีเอ็นเอ (probe) ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามกรรมวิธีของ PCR DIG Probe Synthesis (Roche) เปรียบเทียบผลกับการปฏิกิริยาลูกโซ่ปกติโดยใช้คู่ไพรเมอร์เดียวกัน (control) โดยเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (MK) โดยขนาดคาดหวังของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ปกติอยู่ที่ประมาณ 600 bp

5.1.1. การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนกลุ่ม *MeAVP1*

โครงสร้างพลาสมิดสายผสมของยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* ได้ถูกสร้างให้อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 2 ชนิดคือ 35S และ patatin โปรโมเตอร์ ประกอบด้วยโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::*MeAVP1_1* pBI121:pat::*MeAVP1_1* pBI121:35S::*MeAVP1_2* และ pBI121:pat::*MeAVP1_2* (ตารางที่ 10) ซึ่งได้ทำการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดสายผสมเข้าสู่มันฝรั่ง จนได้ต้น putative transgenic ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::*MeAVP1_1* (AQ-1) จำนวน 90 ต้น ซึ่งในจำนวนนี้ผ่านการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปแล้วจำนวน 20 ต้น พบ transgenic ที่มียีนเป้าหมายจำนวน 4 line ส่วนในโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::*MeAVP1_1* (AQ-2) มีจำนวน putative transgenic 105 ต้น ผ่านการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนแล้ว 31 ต้น พบต้น transgenic จำนวน 11 line (ตารางที่ 11 และตารางที่ 16) ซึ่งในจำนวน transgenic ทั้ง 9 line มีอยู่ 1 line คือ line AQ-2-5 ซึ่งผ่านการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน ด้วยวิธี Southern blot พบว่ามีการแทรกของยีนเป้าหมายในจีโนมของ transgenic อยู่อย่างน้อย 3 copy

(ภาพที่ 52) นอกจากนี้ transgenic line ดังกล่าวเมื่อผ่านการเปลี่ยนอาหาร ออกเป็น 4 line ย่อย และตรวจสอบซ้ำ พบว่าทั้ง 4 line ย่อยยังคงมีผลปฏิกิริยาถูกโซ่เป็นบวก ส่วน line AQ-2-1 และ AQ-2-3 เป็น transgenic line ที่พบการมีอยู่ของยีนในการตรวจสอบครั้งแรก แต่เมื่อมีการเปลี่ยนอาหาร และตรวจสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ผลปรากฏว่าทั้ง 2 line มีผลปฏิกิริยาถูกโซ่เป็นลบ บ่งชี้ว่า transgene ไม่เสถียร และสูญหายไปในช่วงการเก็บรักษา และจากการตรวจสอบซ้ำใน line AQ-2-2 AQ-2-7 และ AQ-2-8 หลังการเปลี่ยนอาหาร พบว่ายังพบการมีอยู่ของ transgene ใน line ย่อย ซึ่งทั้ง 3 line ดังกล่าวจะถูกนำไปศึกษาด้วยกรรมวิธี Southern blot ต่อไป ในส่วนของยีน *MeAVP1_2* หลังจากผ่านกระบวนการถ่ายโอนยีนพบว่ามีต้น putative transgenic ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeAVP1_2 (AK-1) จำนวน 117 ต้น ผ่านการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่ไปแล้ว 43 ต้น พบต้น transgenic จำนวน 5 line (ตารางที่ 12 และตารางที่ 16) และโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeAVP1_2 (AK-2) มีจำนวนต้น putative transgenic 112 ต้น ผ่านการตรวจสอบแล้ว 54 ต้น พบ transgenic จำนวน 2 line (ตารางที่ 12 และตารางที่ 16) ต้น transgenic ที่ตรวจสอบพบด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์สของทั้ง 4 โครงสร้างพลาสมิดจะถูกนำไปศึกษาเพิ่มเติมด้วยกรรมวิธี southern blot เพื่อตรวจสอบจำนวนชุดของโครงสร้างพลาสมิดยีนเป้าหมาย และตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้น transgenic ด้วยกรรมวิธี semi-quantitative RT-PCR ต่อไป

ตารางที่ 11 แสดงผลสรุปจำนวน transgenic line ทั้งหมดของโครงสร้างพลาสมิดของยีน *MeAVP1_1* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S (pBI121:35S::*MeAVP1_1*; AQ-1) และภายใต้โปรโมเตอร์ *pattatin* (pBI121:*patt*::*MeAVP1_1*; AQ-2) ซึ่งได้แสดงจำนวน line ย่อยของ transgenic line ที่ยังพบการมีอยู่ของยีนหลังผ่านการเปลี่ยนอาหาร รวมถึงสรุปผลการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน (copy number) และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน transgenic line

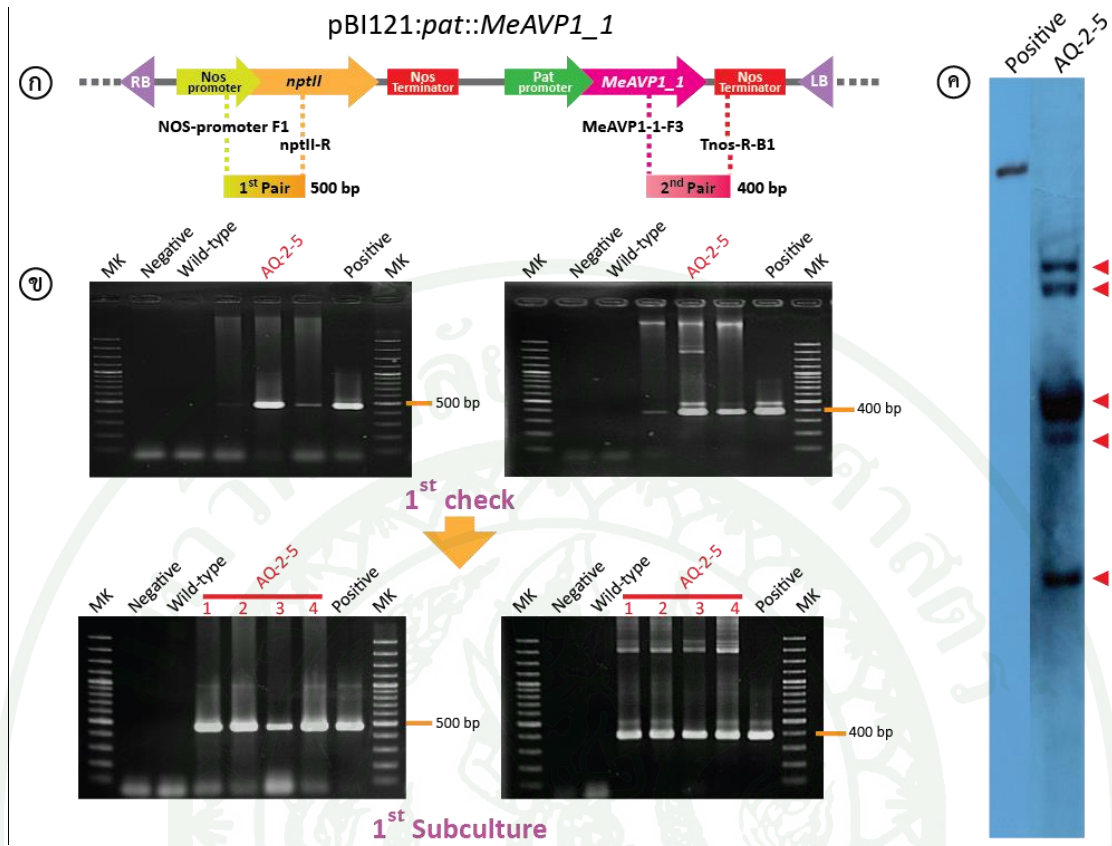
Transgenic Line	สายพันธุ์มันฝรั่ง	จำนวน copy number	Transgenic Expression	จำนวน line ย่อย ที่ยังพบ transgene
pBI121:35S::<i>MeAVP1_1</i> (AQ-1)				
AQ-1-1	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AQ-1-2	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AQ-1-3	Bhu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AQ-1-4	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
pBI121:<i>patt</i>::<i>MeAVP1_1</i> (AQ-2)				
AQ-2-1	At	*	*	*
AQ-2-2	At	N/A	N/A	1 (2 nd Sub)
AQ-2-3	At	*	*	*
AQ-2-4	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AQ-2-5	Spu	>3	N/A	4 (1 st Sub)
AQ-2-6	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AQ-2-7	Spu	N/A	N/A	4 (1 st Sub)
AQ-2-8	Spu	N/A	N/A	2 (1 st Sub)
AQ-2-9	Spu	*	*	*
AQ-2-10	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AQ-2-11	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)

หมายเหตุ * = transgene สูญหายไปในช่วงการเปลี่ยนอาหาร, N/A = อยู่ระหว่างเตรียมดำเนินการ 1st check = การตรวจสอบต้น transgenic ครั้งแรก, ตัวเลข sub = ลำดับครั้งที่เปลี่ยนอาหาร, At = มันฝรั่งสายพันธุ์ Atlantic, Spu = มันฝรั่งสายพันธุ์ Spunta, Bhu = มันฝรั่งสายพันธุ์จากภูฏานในกลุ่ม Desiree

ตารางที่ 12 แสดงผลสรุปจำนวน transgenic line ทั้งหมดของโครงสร้างพลาสมิดของยีน *MeAVP1_2* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S (pBI121:35S::*MeAVP1_2*; AK-1) และภายใต้โปรโมเตอร์ patatin (pBI121:pat::*MeAVP1_2*; AK-2) ซึ่งได้แสดงจำนวน line ย่อยของ transgenic line ที่ยังพบการมีอยู่ของยีนหลังผ่านการเปลี่ยนอาหาร รวมถึงสรุปผลการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน (copy number) และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน transgenic line

Transgenic Line	สายพันธุ์มันฝรั่ง	จำนวน copy number	Transgenic Expression	จำนวน line ย่อย ที่ยังพบ transgene
pBI121:35S::<i>MeAVP1_2</i> (AK-1)				
AK-1-1	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AK-1-2	Bhu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AK-1-3	Bhu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AK-1-4	Bhu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AK-1-5	Bhu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
pBI121:pat::<i>MeAVP1_2</i> (AK-2)				
AK-2-1	At	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AK-2-2	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)

หมายเหตุ * = transgene สูญหายไปในระหว่างการเปลี่ยนอาหาร, N/A = อยู่ระหว่างเตรียมดำเนินการ 1st check = การตรวจสอบต้น transgenic ครั้งแรก, ตัวเลข sub = ลำดับครั้งที่เปลี่ยนอาหาร, At = มันฝรั่งสายพันธุ์ Atlantic, Spu = มันฝรั่งสายพันธุ์ Spunta, Bhu = มันฝรั่งสายพันธุ์จากภูฏานในกลุ่ม Desiree



ภาพที่ 52 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeAVP1_1 ใน transgenic line AQ-2-5

ก) แสดงตำแหน่งไพรเมอร์บนโครงสร้างพลาสมิด โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังประมาณ 400 bp

ข) แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ครั้งแรก (1st check) และการตรวจสอบหลังการเปลี่ยนอาหาร ครั้งที่ 1 (1st subculture) โดยภาพเจลทางด้านซ้ายเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลทางด้านขวาเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบกับผลกับ positive control negative control และ wild-type ค) แสดงผลการวิเคราะห์จำนวนชุดของยีนเป้าหมายใน transgenic line AQ-2-5 ด้วยวิธี Southern blot ซึ่งหัวลูกศรสีแดงบ่งชี้ถึงแถบดีเอ็นเอที่ถูกจับด้วย transgene-specific probe เทียบเคียงผลกับ positive control

5.1.2. การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนกลุ่ม *MeEXO*

ในส่วนของยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* ได้สร้างโครงสร้างพลาสมิดให้อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S และ patatin เช่นเดียวกัน โครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::*MeEXO1* เป็นโครงสร้างพลาสมิดของยีน *MeEXO1* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S มีต้น putative transgenic จำนวน 91 ต้น ผ่านการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนไปแล้ว 25 ต้น พบที่เป็น transgenic อยู่ 2 line (ตารางที่ 13 และตารางที่ 16) ส่วนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::*MeEXO1* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ patatin มีต้น putative transgenic จำนวน 37 ต้น ผ่านการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนไปแล้ว 17 ต้น พบต้นที่เป็น transgenic อยู่ 5 line (ตารางที่ 13 และตารางที่ 16) ใน line AR-2-1 เมื่อผ่านการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน ด้วยกรรมวิธี Southern blot พบว่ามีการแทรกของยีนในจีโนมของ transgenic มากกว่า 3 copy และยังคงตรวจพบ transgene อยู่ เมื่อผ่านการเปลี่ยนอาหาร ออกเป็น 5 line ย่อยแล้ว (ภาพที่ 53) ส่วนในยีน *MeEXO3* โครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::*MeEXO3* มีต้น putative transgenic 153 ต้น ผ่านการตรวจสอบไปแล้ว 26 ต้น พบต้น transgenic จำนวน 7 line (ตารางที่ 14 และตารางที่ 16) ซึ่งใน line รหัส AL-1-1 AL-1-2 AL-1-3 และ AL-1-5 เมื่อผ่านการเปลี่ยนอาหาร และตรวจสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ผลปรากฏว่าให้ผลปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นลบบ่งชี้ถึงการสูญหายไปของ transgene ในระหว่างการเปลี่ยนอาหาร ในส่วนของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::*MeEXO3* มีต้น putative transgenic 116 ผ่านการตรวจสอบการไปแล้ว 30 ต้น พบต้น transgenic 2 line ซึ่งใน line AL-2-1 เมื่อผ่านกระบวนการตรวจสอบซ้ำหลังจากการเปลี่ยนอาหาร ใน line ย่อยของ transgenic line ดังกล่าวให้ผลปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นลบทั้งหมดชี้ให้เห็นการสูญหายของ transgene หลังการเปลี่ยนอาหาร (ตารางที่ 14 และตารางที่ 16)

ตารางที่ 13 แสดงผลสรุปจำนวน transgenic line ทั้งหมดของโครงสร้างพลาสมิดของยีน *MeEXO1* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S (*pBI121:35S::MeEXO1*; AR-1) และภายใต้โปรโมเตอร์ patatin (*pBI121:pat::MeEXO1*; AR-2) ซึ่งได้แสดงจำนวน line ย่อยของ transgenic line ที่ยังพบการมีอยู่ของยีนหลังผ่านการเปลี่ยนอาหาร รวมถึงสรุปผลการตรวจสอบจำนวน ชุดของยีน (copy number) และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน transgenic line

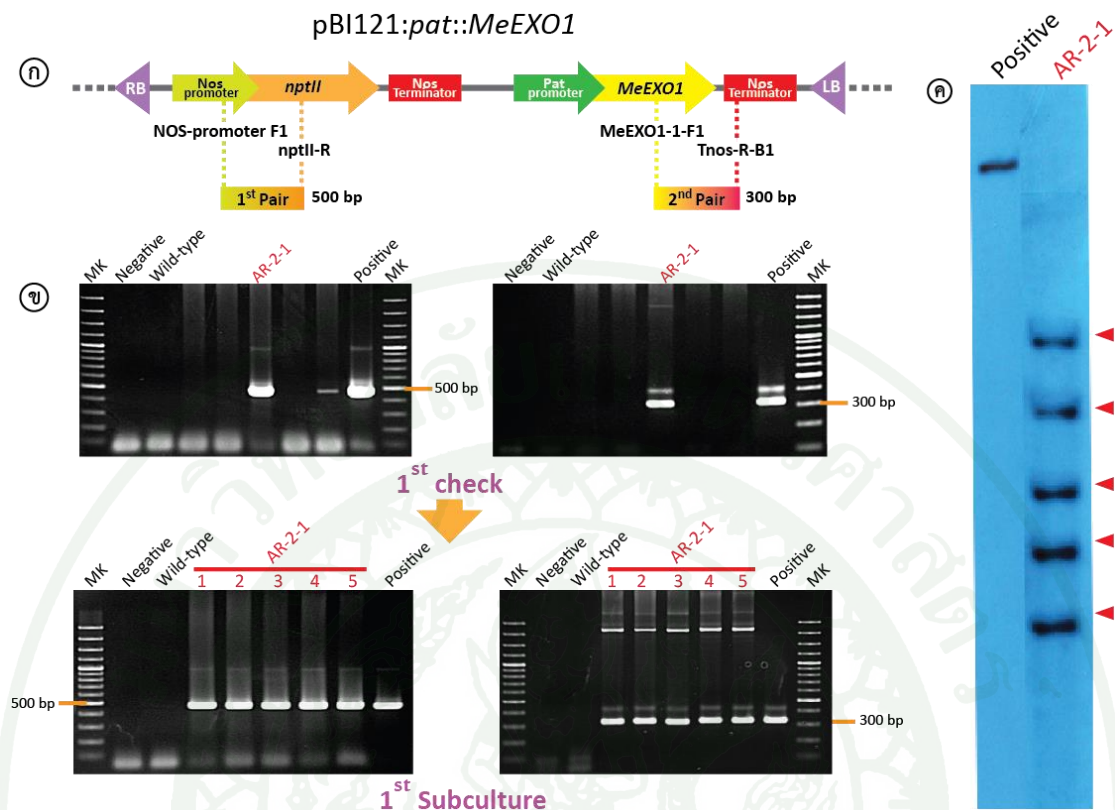
Transgenic Line	สายพันธุ์มันฝรั่ง	จำนวน copy number	Transgenic Expression	จำนวน line ย่อย ที่ยังพบ transgene
pBI121:35S::MeEXO1 (AR-1)				
AR-1-1	Spu	N/A	N/A	3 (1 st Sub)
AR-1-2	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
pBI121:pat::MeEXO1 (AR-2)				
AR-2-1	Spu	>3	N/A	5 (1 st Sub)
AR-2-2	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AR-2-3	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AR-2-4	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AR-2-5	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)

หมายเหตุ N/A = อยู่ระหว่างเตรียมดำเนินการ, 1st check = การตรวจสอบต้น transgenic ครั้งแรก, ตัวเลข sub = ลำดับครั้งที่เปลี่ยนอาหาร, Spu = มันฝรั่งสายพันธุ์ Spunta

ตารางที่ 14 แสดงผลสรุปจำนวน transgenic line ทั้งหมดของโครงสร้างพลาสมิดของยีน *MeEXO3* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S (*pBI121:35S::MeEXO3*; AL-1) และภายใต้โปรโมเตอร์ patatin (*pBI121:pat::MeEXO3*; AL-2) ซึ่งได้แสดงจำนวน line ย่อยของ transgenic line ที่ยังพบการมีอยู่ของยีนหลังผ่านการเปลี่ยนอาหาร รวมถึงสรุปผลการตรวจสอบจำนวน ชุดของยีน (copy number) และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน transgenic line

Transgenic Line	สายพันธุ์มันฝรั่ง	จำนวน copy number	Transgenic Expression	จำนวน line ย่อย ที่ยังพบ transgene
pBI121:35S::MeEXO3 (AL-1)				
AL-1-1	At	*	*	*
AL-1-2	At	*	*	*
AL-1-3	At	*	*	*
AL-1-4	Bhu	N/A	N/A	1 (1 st Sub)
AL-1-5	Bhu	*	*	*
AL-1-6	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AL-1-7	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
pBI121:pat::MeEXO3 (AL-2)				
AL-2-1	Spu	*	*	*
AL-2-2	Bhu	N/A	N/A	1 (1 st Check)

หมายเหตุ * = transgene สูญหายไปในช่วงการเปลี่ยนอาหาร, N/A = อยู่ระหว่างเตรียม
ดำเนินการ 1st check = การตรวจสอบต้น transgenic ครั้งแรก, ตัวเลข sub = ลำดับครั้งที่
เปลี่ยนอาหาร, At = มันฝรั่งสายพันธุ์ Atlantic, Spu = มันฝรั่งสายพันธุ์ Spunta,
Bhu = มันฝรั่งสายพันธุ์จากภูฏานในกลุ่ม Desiree



ภาพที่ 53 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO1 ใน transgenic line AR-2-1

ก) แสดงตำแหน่งไพรเมอร์บนโครงสร้างพลาสมิด โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังประมาณ 300 bp

ข) แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ครั้งแรก (1st check) และการตรวจสอบหลังการเปลี่ยนอาหาร ครั้งที่ 1 (1st subculture) โดยภาพเจลทางด้านซ้ายเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลทางด้านขวาเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบเคียงผลกับ positive control negative control และ wild-type ค) แสดงผลการวิเคราะห์จำนวนชุดของยีนเป้าหมายใน transgenic line AR-2-1 ด้วยวิธี Southern Blot ซึ่งหัวลูกศรสีแดงบ่งชี้ถึงแถบดีเอ็นเอที่ถูกจับด้วย transgene-specific probe เทียบเคียงผลกับ positive control

5.1.3. การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *MeMRB1*

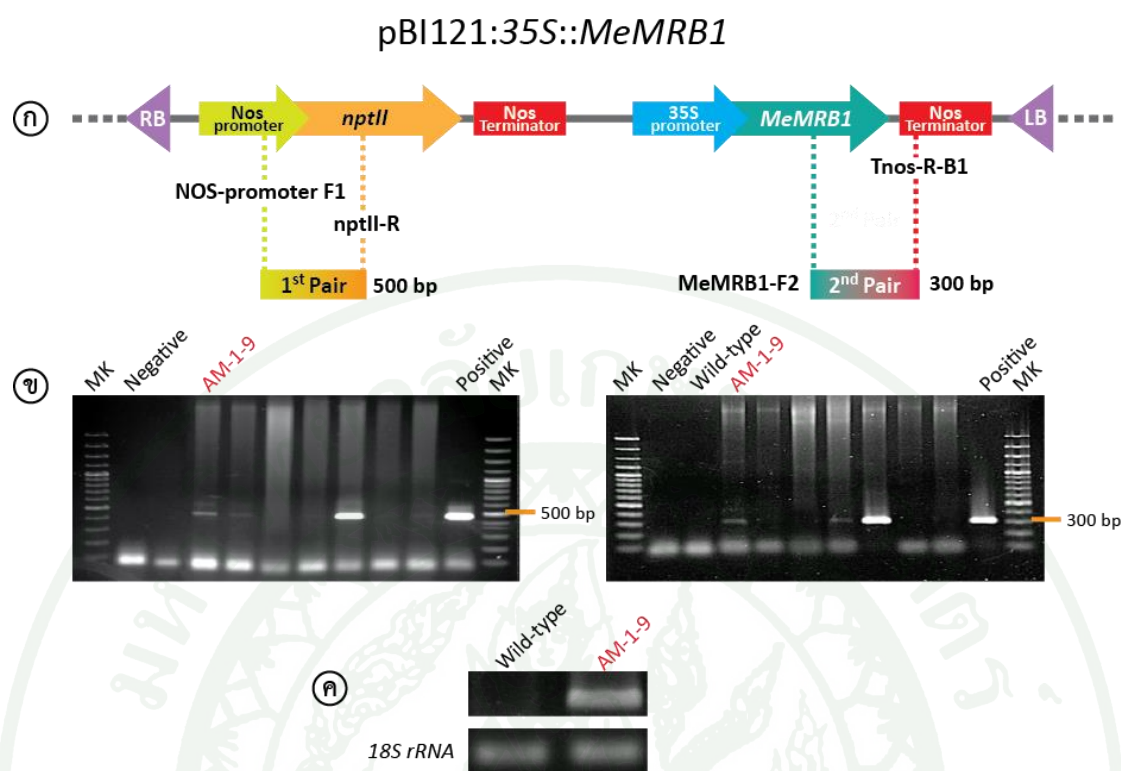
โครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeMRB1 ของยีน *MeMRB1* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S ได้ถ่ายโอนเข้าสู่มันฝรั่งเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน โดยมีต้นที่เป็น putative transgenic จำนวน 117 ต้น ผ่านการตรวจสอบยืนยันการมีอยู่ของยีนไปแล้ว 27 ต้น ซึ่งพบเป็น transgenic จำนวน 11 line (ตารางที่ 15 และตารางที่ 16) และจากการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนใน transgenic line ข้างต้น พบว่าใน line AM-1-9 มีการแสดงออกของยีน *MeMRB1* แต่ในต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้ทำการถ่ายโอนยีน (wild-type) ไม่มีการแสดงออกของยีน เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi quantitative RT-PCR (ภาพที่ 54ค) และใน line รหัส AM-1-2 AM-1-3 AM-1-4 AM-1-5 AM-1-6 AM-1-7 และ AM-1-8 เป็น transgenic line ที่เมื่อผ่านการเปลี่ยนอาหาร แล้วทำการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนซ้ำ ให้ผลปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เป็นลบ ส่วนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeMRB1 ซึ่งอยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ patatin มีต้น putative transgenic จำนวน 135 ต้น ผ่านการตรวจสอบไปแล้ว 52 ต้นพบเป็น transgenic จำนวน 6 line (ตารางที่ 15 และตารางที่ 16) ส่วนใน line ที่มีเครื่องหมายดอกจัน คือ AM-2-2 เป็น transgenic ที่มีผลปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เป็นลบหลังจากผ่านการเปลี่ยนอาหาร

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนกลุ่ม *MeAVP1* *MeEXO* และ *MeMRB1* ผ่านการยืนยันด้วยกรรมวิธีปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ ทำให้ได้ transgenic line ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนม ตามที่สรุปไว้ในตารางที่ 16 ซึ่งในขั้นแรก transgenic line ทั้งหมดจะถูกประเมินลักษณะฟีโนไทป์ที่เกิดขึ้นภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนำสู่แปลงปลูกทดลองเพื่อพิจารณาลักษณะฟีโนไทป์ในสภาพแวดล้อมจริงว่าต้น transgenic line มีลักษณะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปหรือไม่และอย่างไร เพื่อติดตามผลกระทบของยีนเป้าหมายต่อกระบวนการเจริญเติบโตของพืชตามเป้าหมายต่อไป

ตารางที่ 15 แสดงผลสรุปจำนวน transgenic line ทั้งหมดของโครงสร้างพลาสมิดยีน *MeMRB1* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 35S (*pBI121:35S::MeMRB1*; AM-1) และภายใต้โปรโมเตอร์ patatin (*pBI121:pat::MeMRB1*; AM-2) ซึ่งได้แสดงจำนวน line ย่อยของ transgenic line ที่ยังพบการมีอยู่ของยีนหลังผ่านการเปลี่ยนอาหาร รวมถึงสรุปผลการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน (copy number) และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน transgenic line

Transgenic Line	สายพันธุ์มันฝรั่ง	จำนวน copy number	Transgenic Expression	จำนวน line ย่อย ที่ยังพบ transgene
pBI121:35S::MeMRB1 (AM-1)				
AM-1-1	At	N/A	N/A	6 (3 rd Sub)
AM-1-2	At	*	*	*
AM-1-3	At	*	*	*
AM-1-4	At	*	*	*
AM-1-5	At	*	*	*
AM-1-6	At	*	*	*
AM-1-7	At	*	*	*
AM-1-8	At	*	*	*
AM-1-9	Spu	N/A	/	1 (1 st Check)
AM-1-10	Bhu	N/A	N/A	1 (1 st Sub)
AM-1-11	Bhu	N/A	N/A	1 (1 st Check))
pBI121:pat::MeMRB1 (AM-2)				
AM-2-1	At	N/A	N/A	5 (2 nd Sub)
AM-2-2	At	*	*	*
AM-2-3	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AM-2-4	Bhu	N/A	N/A	2 (1 st Sub)
AM-2-5	Bhu	N/A	N/A	1 (1 st Check)
AM-2-6	Spu	N/A	N/A	1 (1 st Check)

หมายเหตุ * = transgene สูญหายไปในระหว่างการเปลี่ยนอาหาร, N/A = อยู่ระหว่างเตรียมดำเนินการ / = พบว่าการแสดงออกของยีน 1st check = การตรวจสอบต้น transgenic ครั้งแรก, ตัวเลข sub = ลำดับครั้งที่เปลี่ยนอาหาร, At = มันฝรั่งสายพันธุ์ Atlantic, Spu= มันฝรั่งสายพันธุ์ Spunta, Bhu = มันฝรั่งสายพันธุ์จากภูฏานในกลุ่ม Desiree



ภาพที่ 54 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeMRB1 ใน transgenic line AM-1-9

ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeMRB1 (AM-1) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 300 bp

ข) ผลเจลอเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeMRB1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส โดยภาพเจลอทางด้านซ้ายเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลอทางด้านขวาเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบเคียงผลกับ positive control negative control และ wild-type ซึ่ง transgenic line จะแสดงชื่อด้วยอักษรสีแดง ค) ผลเจลอเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน MeMRB1 ใน line AM-1-9 โดยเทียบเคียงผลกับ wild-type และใช้ผลการแสดงออกของยีน 18S rRNA เป็นตัวแปรควบคุม

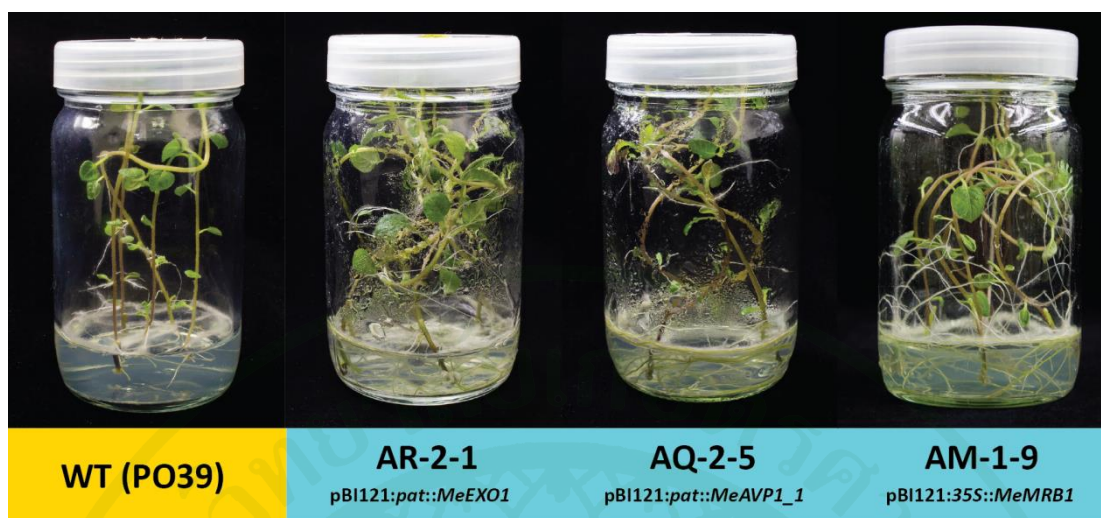
ตารางที่ 16 แสดงผลสรุปจำนวนต้น putative transgenic และต้น transgenic ทั้งหมดของแต่ละโครงสร้างพลาสมิดของยีนมันสำปะหลังเป้าหมาย

ยีนเป้าหมาย	โครงสร้างพลาสมิด	จำนวนต้น putative transgenic	จำนวนต้น putative transgenic ที่ตรวจสอบแล้ว	จำนวน Original transgenic	จำนวนต้น Transgenic Line หลัง การเปลี่ยนอาหาร
<i>MeAVP1_1</i>	pBI121:35S::MeAVP1_1	90	20	4	N/A(4)
	pBI121:pat::MeAVP1_1	105	31	11	4(7)+ N/A(4)
<i>MeAVP1_2</i>	pBI121:35S::MeAVP1_2	117	43	5	N/A(5)
	pBI121:pat::MeAVP1_2	112	21	2	N/A(2)
<i>MeEXO1</i>	pBI121:35S::MeEXO1	91	25	2	1(1)+N/A(1)
	pBI121:pat::MeEXO1	37	17	5	1(1)+N/A(4)
<i>MeEXO3</i>	pBI121:35S::MeEXO3	153	24	7	1(5)+ N/A(2)
	pBI121:pat::MeEXO3	116	30	2	0(1)+N/A(1)
<i>MeMRB1</i>	pBI121:35S::MeMRB1	117	27	11	2(9)+ N/A(2)
	pBI121:pat::MeMRB1	135	52	6	2(3)+ N/A(3)

หมายเหตุ ตัวเลข(ตัวเลข) = จำนวนที่เหลือจากจำนวนที่ตรวจสอบในวงเล็บ, N/A(ตัวเลข) = จำนวนที่อยู่ระหว่างดำเนินการเปลี่ยนอาหาร

5.2. การตรวจสอบลักษณะฟีโนไทป์

ในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนกลุ่ม *MeAVP1* *MeEXO* และ *MeMRB1* ผ่านการยืนยันด้วยกรรมวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส ทำให้ได้ transgenic line ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนม ตามที่สรุปไว้ในตารางที่ 16 ซึ่ง ในขั้นแรก transgenic line ทั้งหมดจะถูกประเมินลักษณะฟีโนไทป์ที่เกิดขึ้นภายในขอบเขตเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อตรวจสอบผลกระทบของยีนต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชในเบื้องต้น จากการตรวจสอบเบื้องต้นได้พิจารณาลักษณะฟีโนไทป์ภายในขอบเขตเลี้ยงเนื้อเยื่อของ transgenic line ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่ามีการแทรกของยีนในจีโนมของต้น transgenic คือ AR-2-1 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO1 และ line AQ-2-5 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeAVP_1 และใน line ที่พบการแสดงออกของยีนในต้น transgenic คือ line AM-1-9 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeMRB1 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของทั้ง 3 line เทียบกับลักษณะของต้นมันฝรั่งที่ไม่ถูกถ่ายโอนยีน (wild-type; WT) โดยเปรียบเทียบลักษณะของใบ ลำต้น และราก (ภาพที่ 55) พบว่าลักษณะจากการสังเกตเบื้องต้นไม่พบความแตกต่างของต้นพืชอย่างเด่นชัด อาจจะมีปริมาณของรากที่มากกว่า และขนาดของใบที่ใหญ่กว่าเพียงเล็กน้อยแต่ก็ไม่อาจชี้ชัดได้ว่าเกิดจากผลของยีนโดยตรงหรือไม่ เพื่อให้เห็นความเปลี่ยนแปลงภายในขอบเขตที่แน่ชัดอาจจะต้องนำไปวัดน้ำหนักแห้ง วัดขนาด และปริมาณของเซลล์ได้กล้างจุลทรรศน์ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างที่แน่ชัดของต้น transgenic และต้นมันฝรั่งปกติภายในขอบเขตเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่อย่างไรก็ตามการพิจารณาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงภายในขอบเขตเลี้ยงเนื้อเยื่อขั้นต้นนี้อาจจะไม่สามารถยืนยันผลกระทบของยีนต่อการเจริญเติบโตของพืชได้จริง ดังนั้นจึงนำต้น transgenic ที่ผ่านการตรวจสอบขั้นต้นแล้วไปสู่แปลงปลูกทดลองเพื่อพิจารณาลักษณะฟีโนไทป์ที่แท้จริงว่า ยีนเป้าหมายมีผลกระทบต่อลักษณะการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรในสภาพแวดล้อมจริง



ภาพที่ 55 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะฟีโนไทป์ของต้น transgenic line AR-2-1, AQ-2-5 และ AM-1-9 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO1, pBI121:pat::MeAVP1_1 และ pBI121:35S::MeMRB1 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับมันฝรั่งที่ไม่ได้ถูกถ่ายโอนยีน (WT) สายพันธุ์ Spunta

วิจารณ์

1. การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มยีนเป้าหมาย *AVP1 EXO* และ *MRBI* ในมันสำปะหลัง

การศึกษาลำดับของกรดอะมิโน และการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของยีนเป้าหมายในกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRBI* เป็นกระบวนการขั้นต้นที่สามารถใช้คัดเลือกแยกยีนเป้าหมายออกจากจีโนมของมันสำปะหลัง เพื่อให้ได้ยีนคู่เหมือนที่น่าจะมีหน้าที่สอดคล้องและใกล้เคียงกันกับยีนต้นแบบจากต้น *Arabidopsis* ซึ่งข้อมูลจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจะเป็นข้อมูลที่จะช่วยวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนที่น่าจะมีโครงสร้างสัมพันธ์กับยีนต้นแบบจากต้น *Arabidopsis* และการวิเคราะห์กลุ่มยีนเป้าหมายด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการ จะทำให้สามารถจำแนกยีนที่มีความใกล้ชิดกับยีนต้นแบบจากต้น *Arabidopsis* ที่น่าจะยังคงรักษาบทบาทหน้าที่ของยีนต่อกลไกการเจริญเติบโตของพืช การศึกษาความใกล้ชิดของยีนจะได้ทำการศึกษาร่วมไปกับการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนเป้าหมายในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลัง ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจกลไกการทำงานเบื้องต้นของยีนเป้าหมาย และสามารถแยกยีนเป้าหมายที่มีกลไกการทำงานสอดคล้องกับกระบวนการเจริญพัฒนาของรากสะสมอาหารในมันสำปะหลังได้

1.1. การวิเคราะห์จำแนกยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1* ในมันสำปะหลัง

จากการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของกลุ่มยีน *MeAVP1* ในมันสำปะหลัง จำนวน 7 ยีน กับยีนแม่แบบ *AtAVP1* และกลุ่มยีน *AVP1* ในพืชชนิดอื่น จะเห็นได้ว่ากลุ่มยีน *AVP1* จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มโปรตีน H^+ -PPases Type I (*AVP1*) และกลุ่มโปรตีน H^+ -PPases Type II (*AVP2/ AVPL1*) แต่เนื่องจากกลุ่มโปรตีน H^+ -PPases Type II เป็นโปรตีนที่พบอยู่ที่เยื่อหุ้มของกอลจิบอดี (Golgi body) ซึ่งต่างจาก *AVP1* ที่จะอยู่บริเวณเยื่อหุ้มของแวคิวโอล (Sarafian *et al.*, 1992; Mitsuda *et al.*, 2001) ทำให้บทบาทหน้าที่ของ *AVP2/AVPL1* ต่อกลไกภายในเซลล์จึงแตกต่างไปจาก *AVP1* ซึ่งมีรายงานว่า *AVP2* น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการ PPi synthesis มากกว่ากระบวนการ PPi hydrolysis ที่พบใน *AVP1* (Drozdowicz *et al.*, 2000) ดังนั้นจึงให้ความสำคัญกับกลุ่มยีน *MeAVP1* ที่อยู่ในกลุ่มของโปรตีน H^+ -PPases Type I ซึ่งประกอบไปด้วยยีน *MeAVP1_1* *MeAVP1_2* *MeAVP1_3* *MeAVP1_4* และ *MeAVP1_5* มากกว่าเนื่องจากมีความเป็นไปได้ที่จะมีการแสดงบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของพืชเหมือนเช่นยีน *AtAVP1* เมื่อพิจารณาแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการในกลุ่มโปรตีน H^+ -PPases Type I พบว่าโปรตีนกลุ่มนี้จะ

ถูกแยกออกเป็น 2 แขนงย่อย คือแขนงของยีน *PfAVP1* ซึ่งเป็นโปรตีน H^+ -PPases ที่พบในโปรโตซัว *Plasmodium falciparum* ส่วนแขนงหนึ่งเป็นกลุ่มโปรตีน H^+ -PPases ที่พบในพืช กลุ่มโปรตีน H^+ -PPases ในพืชจะถูกแบ่งออกเป็นอีก 3 กลุ่มย่อย กลุ่มแรกจะเป็นกลุ่มของยีน *VvAVP1* ที่พบในองุ่น (*Vitis vinifera*) ซึ่งยีน *MeAVP1_2* และ *MeAVP1_4* ของมันสำปะหลังถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีน *VvAVP1* กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มของยีน *AVP1* ที่พบในธัญพืชเช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลี และกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของยีนที่มีความใกล้ชิดกับยีนต้นแบบ *AtAVP1* ของต้น *Arabidopsis* ซึ่งยีน *MeAVP1_1* *MeAVP1_3* และ *MeAVP1_5* ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มนี้ และยีน *MeAVP1_3* และ *MeAVP1_5* มีความคล้ายคลึงกันมากของลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างโปรตีน ซึ่งน่าจะเกิดมาจาก gene duplication หลังมันสำปะหลังได้แยกเป็นสปีชีส์แล้ว จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ายีน *AVP1* ของมันสำปะหลังมีวิวัฒนาการจากต้นกำเนิด 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีต้นกำเนิดเดียวกับยีน *AVP1* ในองุ่น และกลุ่มที่มีต้นกำเนิดเดียวกันกับต้น *Arabidopsis* แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาในลำดับกรดอะมิโนของทั้ง 2 กลุ่มก็ยังคงพบว่าการอนุรักษ์ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณที่สำคัญต่อการทำงานของโปรตีน H^+ -PPases

เมื่อพิจารณาการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากกลุ่มยีน *AVP1* ในมันสำปะหลังซึ่งประกอบด้วย *MeAVP1_1* *MeAVP1_2* *MeAVP1_3* *MeAVP1_4* และ *MeAVP1_5* เปรียบเทียบกับโปรตีนจากยีนแม่แบบ *AtAVP1* จากต้น *Arabidopsis* และโปรตีนจากกลุ่มยีน *AVP1* จากพืชชนิดอื่น พบว่ามีการอนุรักษ์ของกรดอะมิโนสูง โดยเฉพาะบริเวณกรดอะมิโนช่วง 235 ถึง 320 (ภาพที่ 18) ซึ่งเมื่อเทียบกับโครงสร้าง putative transmembrane protein ของโปรตีน *AVP1* (ภาพที่ 21) จะพบว่าอยู่ในส่วนของโปรตีนบริเวณ loop ที่ 5 ซึ่งไม่ได้แทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มแควิวโอล โดยบริเวณนี้จะมีลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญที่มีการอนุรักษ์เอาไว้คือ DVGADLVGKVE ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง H^+ -PPase ที่อยู่บนเยื่อหุ้มแควิวโอล และเอนไซม์ PPase ที่ละลายอยู่ในไซโตพลาสซึมชี้ให้เห็นว่าบริเวณอนุรักษ์ที่มีโครงสร้างเป็น (E/D)(X)₇KXE น่าจะเป็นบริเวณที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ของเอนไซม์ PPase (Rea *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994) นอกจากนี้การใช้ โพลีโคลนอล แอนติบอดี (polyclonal antibody) ที่ไปจับจำเพาะลำดับกรดอะมิโน DVGADLVGKVE ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ PPi hydrolysis และ PPi -dependent H^+ transport (Takasu *et al.*, 1997) ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าบริเวณอนุรักษ์ที่มีโครงสร้างเป็น (E/D)(X)₇KXE น่าจะเป็นบริเวณที่ PPi เข้ามาจับ (putative PPi binding domain) และเกิดกระบวนการ hydrolysis ของโมเลกุล PPi บนเอนไซม์ H^+ -PPase

ในช่วงอนุรักษของกลุ่มยีน *MeAVP1* ที่สำคัญอีกบริเวณหนึ่ง จะอยู่บริเวณช่วง ลำดับกรดอะมิโนที่ 429 ถึง 471 (ภาพที่ 18) ซึ่งบริเวณนี้จะมีบริเวณอนุรักษของกรดอะมิโนที่สำคัญ คือ EYYTS โดยตำแหน่งนี้อยู่บริเวณ loop ที่อยู่หลัง transmembrane domain ที่ 9 ซึ่งเป็น loop ที่อยู่ใน ไซโตพลาสซึมของเซลล์ จากการศึกษาหน้าที่ของบริเวณอนุรักษ ดังกล่าว ด้วยการทำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนตัวแรกของบริเวณอนุรักษ คือ glutamic acid (E) ที่ เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นลบ เป็น glutamine (Q) ที่เป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุ ทำให้คุณสมบัติ บริเวณ motif เปลี่ยนไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพในกระบวนการขนส่ง H^+ ในเซลล์ลดลง (Zhen *et al.*, 1997) แสดงให้เห็นว่าบริเวณอนุรักษดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่ง H^+ ที่อยู่ใน ไซโตพลาสซึมเข้ามาเก็บไว้ในแวคิวโอล (putative H^+ translocation domain)

ผลจากการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของกลุ่มยีน *AVP1* ซึ่งให้ผลการอนุรักษลำดับ กรดอะมิโนที่สำคัญ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ hydrolysis ของโมเลกุล PPi และกระบวนการ ขนส่ง H^+ มาเก็บไว้ในแวคิวโอล ของกรดอะมิโนจากกลุ่มยีน *MeAVP1* ในมันสำปะหลัง แสดงให้ เห็นว่ากลุ่มยีนดังกล่าวน่าจะยังคงรักษาทบทางหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีน $H^+-PPase$ ที่น่าจะ เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของพืชเอาไว้ในระบบมันสำปะหลัง

การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของกลุ่มยีน *MeAVP1* ทั้ง 5 ยีนขึ้นต้นในบางเนื้อเยื่อ ของมันสำปะหลัง แสดงให้เห็นว่า ยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนา รากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง กล่าวคือทั้งสองยีนมีการแสดงออกที่สูงชัดเจนในเนื้อเยื่อมัน สำปะหลังส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อส่วน underground ทั้งหมด (ภาพที่ 28) ซึ่งเมื่อนำทั้ง 2 ยีนไปศึกษาแบบ แผนการแสดงออกอย่างละเอียดพบว่า *MeAVP1_1* มีแนวโน้มการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากรากสะสม อาหารอายุ 2 เดือน จนถึง 3 เดือน และลดลงเมื่อรากสะสมอาหารมีอายุ 6 เดือน ส่วน *MeAVP1_2* มี การแสดงออกสูงตั้งแต่ระยะรากที่มีการ โป่งพอง (TR1, TR2) และระดับการแสดงออกในรากสะสม อาหารมีแนวโน้มลดระดับจนรากมีอายุ 6 เดือน จากลักษณะการแสดงออกดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* มีแนวโน้มที่จะมีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อของรากสะสมอาหารของ มันสำปะหลังที่มีอายุน้อยและลดระดับการแสดงออกลงจนรากมีการพัฒนาเป็นรากสะสมอาหารที่มี อายุมากขึ้น (ภาพที่ 29) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Martinoia *et al.* (2007) ที่ได้รายงานว่า $H^+-PPase$ มีการทำงานสูงในเนื้อเยื่อพืชที่มีอายุน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าในเนื้อเยื่อของรากที่เริ่มมีการ โป่งพองมีระดับการแสดงออกของทั้งสองยีนที่สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน *MeAVP1_2* ที่มีการ แสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อระยะนี้สูงที่สุด ในระยะที่รากเริ่มมีการ โป่งพองนี้เป็นระยะที่รากถูก กระตุ้นให้มีการขยายขนาดมากขึ้น เป็นผลมาจากกระบวนการแบ่งเซลล์ในรากที่เพิ่มมากขึ้น

(Wilson and Lowe, 1973) จากการศึกษาการเกิดหัวของมันฝรั่งซึ่งเป็นพืชที่มีกระบวนการสร้างอวัยวะสะสมอาหารใกล้เคียงกับมันสำปะหลังของ Roumeliotis *et al.* ในปี 2012 แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนออกซินมีส่วนในกระบวนการกระตุ้นการสร้างหัวของมันฝรั่ง ซึ่งจากการศึกษาหน้าที่ของยีน *AVP1* ในต้น *Arabidopsis* พบว่ายีน *AVP1* มีบทบาทต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ในพืช ผ่านการกระตุ้นกระบวนการขนส่งฮอร์โมนออกซินของพืช (Li *et al.*, 2005) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงของรากที่มีอายุน้อยให้มีการพัฒนาขยายขนาด เพื่อเปลี่ยนรากเหล่านั้นให้มีหน้าที่ในการสะสมอาหาร ผ่านการกระตุ้นการขนส่งออกซินทำให้เกิดการกระบวนการแบ่งเซลล์ภายในรากเพิ่มมากขึ้น ทำให้รากเกิดการโป่งพองและพัฒนาเป็นรากสะสมอาหารต่อไป

1.2. การวิเคราะห์จำแนกยีนเป้าหมายกลุ่ม *EXO* ในมันสำปะหลัง

การสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของยีน *EXO* ในมันสำปะหลังทั้ง 9 ยีนที่มีโครงสร้างยีนคล้ายคลึงกับ *AtEXO* กับยีนในพืชชนิดอื่นที่สืบพบในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามียีนจากมันสำปะหลังจำนวน 5 ยีน ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีน *AtEXO* ประกอบไปด้วยยีน *MeEXO1* *MeEXO2* *MeEXO3* *MeEXO4* และ *MeEXO5* ดังภาพที่ 21 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนจากมันสำปะหลังทั้ง 5 ยีน มีความใกล้ชิดกับ *AtEXO* สูง เมื่อพิจารณาในรายละเอียดของแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของยีนในกลุ่มนี้ พบว่ามีการแยกของยีนออกเป็น 2 แขนง คือแขนงของยีน *EXORDIUM-LIKE1 (EXL1)* ซึ่งยีน *EXL1* เป็นหนึ่งในสมาชิกของ gene family เดียวกันกับยีน *EXO* โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของพืชเช่นกัน (Schroder *et al.*, 2011) และแขนงของกลุ่มยีน *EXO* ซึ่งพบว่ายีน *MeEXO1* และ *MeEXO2* ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ใกล้ชิดกับยีน *AtEXO* มากกว่ายีน *MeEXO3* *MeEXO4* และ *MeEXO5* ที่ถูกจัดให้แยกออกไปรวมในกลุ่มเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามยีนจากมันสำปะหลังทั้ง 5 ยีน ก็ยังคงมีความใกล้ชิดกันอยู่มาก นอกจากนี้มีการจัดโปรตีน PHOSPHATE INDUCED-1 (*PHI-1*) ที่พบในต้นยาสูบให้อยู่ในกลุ่มนี้ด้วย โดยยีนดังกล่าวถูกพบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ *AtEXO* ถึง 76 % และน่าจะมียีนที่มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการเริ่มการแบ่งเซลล์ของพืช (Sano *et al.*, 1999; Farrar *et al.*, 2003) ด้วยข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการข้างต้นชี้ให้เห็นว่ายีน *MeEXO* ทั้ง 5 ยีนมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *AtEXO* มาก และยีนอื่นที่มีการวิวัฒนาการใกล้กับยีน *AtEXO* ยังคงมีกลไกที่ทำหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์อยู่ ดังนั้นยีน *MeEXO* ทั้ง 5 ยีนจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีการรักษายีนที่เกี่ยวกับกระบวนการเจริญเติบโตของพืชเช่นกัน

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน *MeEXO1* *MeEXO2* *MeEXO3* *MeEXO4* และ *MeEXO5* กับกรดอะมิโนของยีนแม่แบบ *AtEXO* พบว่ามีการอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนค่อนข้างสูง (ภาพที่ 22) โดยเฉพาะกรดอะมิโนบริเวณปลาย C-terminal ของสายโปรตีน เมื่อพิจารณากรดอะมิโนบริเวณ N-terminal ของโปรตีนจากยีนมันสำปะหลังทั้ง 5 ยีน จะพบว่าช่วง 100 กรดอะมิโนแรกของสายโปรตีน จะมีจำนวนของกรดอะมิโน leucine (L) และ isoleucine (I) ค่อนข้างมาก เช่นเดียวกันโปรตีนของ *AtEXO* ของต้น *Arabidopsis* นอกจากนี้ในบริเวณ N-terminal ของสายโปรตีนจะมีการอนุรักษ์ของกรดอะมิโน alanine (A) และ arginine (R) ที่ตรงกับตำแหน่งที่ 21 และ 22 ของกรดอะมิโนของยีน *AtEXO* (ภาพที่ 22) ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวได้ถูกคาดคะเนไว้ว่า น่าจะเป็น cleavable N-terminal signal sequence ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญต่อหน้าที่ของโปรตีน *AtEXO* (Farrar *et al.*, 2003) ส่วนการคาดคะเนตำแหน่งโปรตีน (protein localization) ของยีน *MeEXO* ทั้ง 5 ยีน พบว่าโปรตีน *MeEXO1* *MeEXO3* และ *MeEXO4* น่าจะเป็น extracellular protein ซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งโปรตีน *AtEXO* ซึ่งมีลักษณะเป็น extracellular protein เช่นเดียวกัน (Schroder *et al.*, 2009)

ผลของการศึกษาระดับกรดอะมิโน ควบคู่ไปกับการศึกษาแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการ รวมไปถึงการคาดคะเนตำแหน่งของโปรตีนจากยีน *EXO* ทั้ง 5 ยีน แสดงให้เห็นว่ายีนทั้ง 5 ยีนมีวิวัฒนาการของยีนที่ใกล้เคียงกันมาก รวมถึงการอนุรักษ์ลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญต่อหน้าที่ของโปรตีน *EXO* ให้ยังคงอยู่ในสายโปรตีนของแต่ละยีน ถึงแม้ว่าการคาดคะเนตำแหน่งโปรตีนจะมีเพียงบางยีนเท่านั้นที่ลักษณะเป็น extracellular protein ที่สอดคล้องกับยีนแม่แบบ *AtEXO* อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาขั้นนี้ยังไม่เพียงพอที่จะระบุยีนเป้าหมายในการศึกษาดังนั้นจึงต้องศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนเพิ่มเติมเพื่อคัดเลือกยีนเป้าหมายที่น่าจะมีบทบาทหน้าที่สอดคล้องกับกลไกการเจริญเติบโตของรากสะสมอาหารในมันสำปะหลัง

จากแบบแผนการแสดงออกของยีนในขั้นตอนของกลุ่มยีน *EXO* ในมันสำปะหลังทั้ง 5 ยีน (ภาพที่ 31) พบว่ายีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* มีแบบแผนที่น่าสนใจ กล่าวคือทั้งสองยีนมีการแสดงออกของยีนสูงต่อเนื่องในทุกระยะของรากสะสมอาหาร แต่มีการแสดงออกต่ำในส่วนของการขยาย ดังนั้นจึงนำทั้งสองยีนไปศึกษาแบบแผนการแสดงออกอย่างละเอียด (ภาพที่ 31) พบว่าการแสดงออกของทั้ง 2 ยีนในรากสะสมอาหารยังคงการแสดงออกสูง โดยเฉพาะในรากสะสมอาหารที่มีอายุ 3 และ 6 เดือน ซึ่งจากการศึกษาการเจริญเติบโตของรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง พบว่ารากสะสมอาหารช่วงอายุ 90 วัน (3 เดือน) ขึ้นไป จะมีอัตราการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังที่สูง (Ramanujam, 1985) จึงเป็นไปได้ที่ยีนทั้งสองน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของ

รากสะสมอาหารในช่วงอายุดังกล่าว เมื่อพิจารณาในเนื้อเยื่อ cortex และ parenchyma ที่อายุ 6 เดือน ยีน *MeEXO3* มีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อ parenchyma ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเจริญเติบโตเพื่อใช้ในการสะสมแป้ง (Aleves, 2002; Lebot, 2009) ดังนั้นยีน *MeEXO3* อาจมีบทบาทในกระบวนการเพิ่มการเจริญเติบโตของรากในบริเวณเนื้อเยื่อ parenchyma เพื่อใช้ในการสะสมอาหาร นอกจากนี้ การศึกษาหน้าที่ของยีน *EXO* ในต้น *Arabidopsis* พบว่าการแสดงออกของยีน *AtEXO* มีผลตอบสนองต่อการควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่ม brassinosteroids โดยทำให้มีการเจริญเติบโตของยอดและรากมากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการขยายขนาดของเซลล์พืช (Coll-Garcia *et al.*, 2004; Schroder *et al.*, 2009) จากการศึกษาของ Dhairyasheel (2008) ได้รายงานว่าการส่งสัญญาณของ brassinosteroids มีผลต่อการทำงานของยีนและ transcription factor ในเซลล์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดรากสะสมอาหารของมันเทศ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่ายีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการขยายขนาดของรากสะสมอาหารให้มีการเจริญเติบโตมากขึ้น ผ่านการกระตุ้นกระบวนการขยายขนาดของเซลล์ ซึ่งตอบสนองจากการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของ brassinosteroids

1.3. การวิเคราะห์จำแนกยีนเป้าหมายกลุ่ม *MRB1* ในมันสำปะหลัง

กลุ่มยีน *MRB1* ที่สืบพบในฐานข้อมูลจีโนมของมันสำปะหลังทั้ง 6 ยีนได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการร่วมกับยีนแม่แบบ *AtMRB1* จากต้น *Arabidopsis* และยีนจากพืชชนิดอื่นที่ถูกพบว่ามีแนวโน้มใกล้เคียงกับยีน *AtMRB1* ทำให้สามารถจำแนกยีน *MRB1* ในจีโนมของมันสำปะหลังที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *AtMRB1* ได้ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการดังกล่าว พบว่ามียีนในมันสำปะหลังเพียง 2 ยีน คือ *MeMRB1_1* และ *MeMRB1_2* ที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีน *AtMRB1* โดยเมื่อพิจารณาความใกล้ชิดของทั้ง 2 ยีนกับยีน *AtMRB1* พบว่าถึงแม้ว่าทั้ง 2 ยีนจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันก็ตาม แต่ยีน *MeMRB1_1* มีความใกล้ชิดกับยีนแม่แบบ *AtMRB1* มากกว่ายีน *MeMRB1_2* ซึ่งถูกจัดให้อยู่คนละแขนงย่อยกับกลุ่มยีน *AtMRB1* (ภาพที่ 25) เพื่อให้สามารถเข้าใจความแตกต่างของโครงสร้างโปรตีนระหว่าง *MeMRB1_1* และ *MeMRB1_2* จึงนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากทั้งสองยีนมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากยีนแม่แบบ *AtMRB1* ซึ่งพบว่าลำดับกรดอะมิโนมีการอนุรักษ์มากในช่วงปลาย C-terminal ของสายโปรตีน และพบความแตกต่างที่ชัดเจนบริเวณ N-terminal ของสายโปรตีน โดยจะเห็นว่าช่วงของกรดอะมิโนลำดับที่ 50 -80 มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนประมาณ 30 กรดอะมิโนในสายโปรตีนของยีน *MeMRB1_2* ซึ่งเมื่อพิจารณาควบคู่ไปกับยีน *MeMRB1_1* และยีน *AtMRB1* จะเห็นว่าบริเวณดังกล่าวเป็นช่วงที่มีการอนุรักษ์ของลำดับ

กรดอะมิโนของสองยีนนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์โครงสร้าง transmembrane protein ของโปรตีนจากยีน *MeMRB1_1* และ *MeMRB1_2* (ภาพที่ 26) โดยโครงสร้าง transmembrane protein ของโปรตีน *MeMRB1_1* โดยรวมมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนจากยีนแม่แบบ *AtMRB1* มาก โดยมีการอนุรักษ์ transmembrane domain ที่พบใน *AtMRB1* เอาไว้ทั้งหมด แต่มีการเพิ่ม transmembrane domain บางโดเมนเข้ามาที่บริเวณ N-terminal ในทางกลับกันเมื่อพิจารณาที่โปรตีน *MeMRB1_2* พบว่ามีการขาดหายไปของ transmembrane domain 2 โดเมนแรก ซึ่งตรงกับช่วงกรดอะมิโนที่ขาดหายไปที่พบในการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน คือช่วงกรดอะมิโนลำดับที่ 50-80 แต่อย่างไรก็ตาม *MeMRB1_2* มีการอนุรักษ์ transmembrane domain 2 โดเมนสุดท้ายของโปรตีน *AtMRB1* เอาไว้ และยังมีการอนุรักษ์ในโดเมนที่ 2 และ 4 ของโปรตีน *MeMRB1_1* เอาไว้อีกด้วย จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่ายีน *MeMRB1_1* มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับ *AtMRB1* มากกว่ายีน *MeMRB1_2* ซึ่งน่าจะเกิดจากการวิวัฒนาการของยีน *MeMRB1_2* ที่ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปจนอาจมีบทบาทหน้าที่ต่างออกไปจากยีน *AtMRB1* และ *MeMRB1_1*

การศึกษาแบบแผนการแสดงออกขั้นต้นของยีน *MeMRB1_1* และ *MeMRB1_2* (ภาพที่ 32) พบว่าเฉพาะยีน *MeMRB1_1* เท่านั้นที่มีการแสดงออกในระบบของรากสะสมอาหารมันสำปะหลังโดยพบการแสดงออก ในเนื้อเยื่อส่วนของรากสะสมอาหารอายุ 2 เดือน โดยเฉพาะในรากสะสมอาหารชั้น cortex จึงนำเฉพาะ *MeMRB1_1* ไปศึกษาแบบแผนการแสดงออกอย่างละเอียด พบว่าการแสดงออกของยีน *MeMRB1_1* มีการแสดงออกสูงอย่างเด่นชัดในแต่ละระยะของรากสะสมอาหาร เมื่อพิจารณาแต่ละชั้นของรากสะสมอาหารพบว่าในเนื้อเยื่อชั้น cortex มีการแสดงออกของยีนลดลงเมื่ออายุมากขึ้น แต่ในเนื้อเยื่อ parenchyma มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อมีอายุรากมีอายุเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 33) ซึ่งเป็นช่วงอายุที่มันสำปะหลังมีอัตราการเจริญเติบโตสูง (Ramanujam, 1985) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Guan *et al.* (2009) ที่รายงานว่าพบการแสดงออกของยีน *AtMRB1* ในรากที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ แสดงให้เห็นว่ายีน *MeMRB1_1* มีส่วนเกี่ยวข้องในการพัฒนาขยายขนาดของรากสะสมอาหาร โดยลดระดับการแสดงออกของเนื้อเยื่อชั้น cortex และเพิ่มการแสดงออกในเนื้อเยื่อชั้น parenchyma ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ใช้ในการเก็บสะสมอาหาร (Aleves, 2002; Lebot, 2009) และการศึกษาหน้าที่ของยีน *AtMRB1* ในต้น *Arabidopsis* พบว่าเมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *MRB1* ส่งผลให้รากมีมวลเพิ่มขึ้นซึ่งเกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งน่าจะเกิดจากกลไกของยีน *MRB1* ไปกระตุ้นกลุ่มยีนอื่นที่มีผลต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ของพืช เช่น *GRF5* ยีน *ANT* และยีน *ROT3* (Guan *et al.*, 2009) ดังนั้นการแสดงออกของยีน *MeMRB1_1* ที่สูงในเนื้อเยื่อชั้น parenchyma อาจทำให้เกิดการกระตุ้นกลไกของยีน ส่งผลให้เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ในชั้น parenchyma เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในการสะสมแป้งในรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง

นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *MeMRB1_1* ยังมีการแสดงออกสูงในระยะที่รากเริ่มมีการโป่งพอง ซึ่งให้เห็นว่า *MeMRB1_1* อาจจะมีส่วนในกระบวนการเปลี่ยนแปลงของรากฝอย ให้พัฒนาเป็น รากสะสมอาหารอีกด้วย

2. การสร้างพาหะถ่ายโอนยีนเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนเป้าหมาย

การศึกษาหน้าที่ของยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* ในมันสำปะหลังได้ ทำการศึกษาผ่านกระบวนการถ่ายโอนยีนโดยอาศัยแบคทีเรีย *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-mediated gene transformation) ถ่ายโอนโครงสร้างยีนเป้าหมายเข้าสู่พืช ซึ่งยีนเป้าหมายในมันสำปะหลังที่ผ่านการคัดเลือกและจำแนกได้ทั้งหมดจำนวน 5 ยีน ตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 9 ประกอบด้วยยีน *AVP1* จำนวน 2 ยีน คือ *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* กลุ่มยีน *EXO* จำนวน 2 ยีน คือ *MeEXO1* และ *MeEXO3* และกลุ่มยีน *MRB1* มีเพียงยีน *MeMRB1_1* ยีนเดียวให้ชื่อใหม่เป็น *MeMRB1* ซึ่งยีนเหล่านี้น่าจะมีหน้าที่คล้ายคลึงกับยีนแม่แบบจากต้น *Arabidopsis* และน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง โดยยีนเหล่านี้ถูกโคลนแยกด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซและนำไปสร้างโครงสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อใช้ในกระบวนการถ่ายโอนยีน ในแต่ละยีนจะถูกนำไปสร้างโครงสร้างพลาสมิดที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด โปรโมเตอร์ชนิดแรกคือ โปรโมเตอร์ 35S ซึ่งจะทำให้การแสดงออกของยีนเป้าหมายที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์นี้มีการแสดงออกของยีนในปริมาณสูง (Franck *et al.*, 1980) ทำให้สามารถติดตามผลกระทบของยีนเป้าหมายต่อการเจริญเติบโตโดยรวมของต้นพืชได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกสูง มีโอกาสที่จะส่งผลส่งผลกระทบต่อการทำงานของพืชได้ เนื่องจากโปรตีนที่แสดงออกจากยีนที่ถูกถ่ายโอนเข้าไปในพืช อาจจะมีผลเป็นพิษต่อเซลล์พืช หรือมีผลไปยับยั้งกระบวนการทำงานของพืชกระบวนการอื่น (Mason *et al.*, 1996; Richter *et al.*, 2000) ทำให้พืชทั้งต้นมีโอกาที่จะไม่เจริญเติบโต หรือตายลง ในที่สุด ดังนั้นเพื่อลดผลกระทบดังกล่าว โปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกจำเพาะกับอวัยวะพืชจึงถูกเลือกมาศึกษาควบคู่ไปกับโปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกสูง รวมไปถึงโปรโมเตอร์ชนิดดังกล่าวสามารถศึกษาผลกระทบของการแสดงออกของยีน ให้จำเพาะกับอวัยวะที่สนใจได้ ซึ่งในการศึกษานี้สนใจที่จะศึกษาผลกระทบของยีนต่ออวัยวะสะสมอาหาร ด้วยเหตุนี้โครงสร้างพลาสมิดอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการศึกษานี้จึงทำการแทนที่โปรโมเตอร์ 35S ด้วย โปรโมเตอร์ของยีน *patatin* ที่พบในมันฝรั่ง ซึ่งสามารถจะควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายให้มีความจำเพาะต่อส่วนอวัยวะสะสมอาหารของทั้งมันฝรั่ง และมันสำปะหลัง (Ihemere *et al.*, 2006) เพื่อลดผลกระทบที่จะเกิดจากโปรโมเตอร์ 35S ดังกล่าว และใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ผลกระทบจากยีนเป้าหมายที่จำเพาะต่อส่วน

อวัยวะสะสมอาหารที่เป็นเป้าหมายโดยตรง ทั้งนี้โครงสร้างพลาสมิดของยีนทั้งหมดที่สร้างได้แสดงตามตารางที่ 10 ได้ถูกถ่ายโอนเข้าสู่พืชเพื่อศึกษาผลกระทบของยีนต่อการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

3. การวิเคราะห์ต้นมันฝรั่ง Putative transgenic

โครงสร้างพลาสมิดสายผสมของยีนเป้าหมายทั้งหมดถูกถ่ายโอนเข้าสู่พืชแม่แบบมันฝรั่งเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนเป้าหมาย เนื่องจากมันฝรั่งเป็นพืชที่มีกลไกสร้างอวัยวะสะสมอาหารที่คล้ายกับมันสำปะหลัง และสามารถถ่ายโอนยีนได้มีประสิทธิภาพมากกว่ามันสำปะหลัง (Ku *et al.*, 2008) ต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนถูกเลี้ยงให้มีการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์เป็นต้น putative transgenic แล้วจึงนำไปของต้น putative transgenic มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการกระบวนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 16) ซึ่งคู่ไพรเมอร์จะอยู่บริเวณส่วนต้น และส่วนปลายของโครงสร้างพลาสมิด เพื่อที่จะยืนยันว่าโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมายได้ถูกถ่ายโอนเข้าสู่มันฝรั่งทั้งหมด ผลของปฏิกิริยาถูกโซ่ของทั้ง 2 คู่ไพรเมอร์ต้องมีผลเป็นบวกเหมือนกันถึงจะสามารถยืนยันได้ว่าต้น putative transgenic เป็น transgenic ที่มีโครงสร้างพลาสมิดสายผสมของยีนเป้าหมายอยู่ในจีโนม ซึ่งผลที่ได้จะถูกนำไปเทียบกับผลปฏิกิริยาถูกโซ่ของ positive control ที่ใช้ดีเอ็นเอจากโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมายที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Agrobacterium* เป็นดีเอ็นเอสายต้นแบบ ซึ่งผลปฏิกิริยาถูกโซ่ของ putative transgenic ต้องมีขนาดตรงกับ positive control ถึงจะสรุปได้ว่า putative transgenic มีผลปฏิกิริยาถูกโซ่เป็นบวก นอกจากนี้ต้องเทียบเคียงผลควบคู่ไปกับผลปฏิกิริยาถูกโซ่ของ negative control ที่ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอสายต้นแบบ และ ผลปฏิกิริยาถูกโซ่จากดีเอ็นเอของมันฝรั่งที่ไม่ได้ถูกถ่ายโอนยีน (wild-type) เพื่อยืนยันว่าผลปฏิกิริยาถูกโซ่ของ putative transgenic ไม่ได้เกิดข้อผิดพลาดจากการปนเปื้อนระหว่างการเตรียมปฏิกิริยาหรือปนเปื้อนจากโครงสร้างพลาสมิดในต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้ถูกถ่ายโอนยีน จากการตรวจสอบยืนยันดังกล่าวทำให้ได้ต้น transgenic ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเป้าหมาย ตามที่แสดงในตารางที่ 5 จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าต้น transgenic ที่ตรวจสอบพบ มีปริมาณที่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของต้น putative transgenic ที่ได้จากขั้นตอนการ regeneration หลังจากกระบวนการถ่ายโอนยีน ซึ่งอาจจะเป็นเพราะจำนวนต้น putative transgenic ที่นำมาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่มีจำนวนน้อยเช่นกัน แต่เมื่อคิดอัตราส่วนของต้น putative transgenic ที่นำมาตรวจสอบเทียบกับต้น transgenic ที่พบการมีอยู่ของยีน พบว่าต้น transgenic ที่ตรวจพบ มีเพียงแค่ร้อยละ 20 ของต้น putative transgenic ที่นำมาตรวจสอบเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าร้อยละ 80 ของต้น putative transgenic มีโอกาสที่จะเกิดการ regenerate จากเซลล์พืชที่ไม่ได้ถูกถ่ายโอนยีน (non-transformed cell) ซึ่งในความเป็นจริงแล้วอาหารที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนของ

มันฝรั่งหลังการถ่ายโอนยีนในทุกขั้นตอนก่อนที่จะเกิดกระบวนการ regenerate เป็นต้นใหม่ มีการเติมยาปฏิชีวนะ kanamycin ลงไป ทำให้อาหารมีลักษณะเป็น selection media ซึ่งจะช่วยคัดเลือกเฉพาะเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมาย (transformed cell) ที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ kanamycin (*nptII*) เท่านั้นที่สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ แต่เซลล์ที่เป็น non-transformed cell จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยยาปฏิชีวนะ kanamycin (Miki and McHugh, 2004) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ามีโอกาสน้อยมากที่ putative transgenic จะเกิดขึ้นจากเซลล์ที่เป็น non-transformed cell ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า non-transformed cell ที่ไม่มีโครงสร้างพลาสมิดเป้าหมายสามารถหลุดรอดจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของยาปฏิชีวนะ kanamycin ได้ ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวอาจเกิดจากการที่ non-transformed cell อยู่ใกล้ชิดกับ transformed cell หรือมีการหลุดรอดของ *Agrobacterium* ที่มียีนเป้าหมายบนเนื้อเยื่อพืช ทำให้ non-transformed cell ดังกล่าวได้รับการป้องกันยาปฏิชีวนะ kanamycin จาก transformed cell และ *Agrobacterium* ที่สามารถผลิตสารต่อต้านยาปฏิชีวนะ kanamycin ได้ (Park *et al.*, 1998; Domínguez *et al.*, 2004) ด้วยเหตุนี้ non-transformed cell จึงมีโอกาสที่จะหลุดรอดจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของยาปฏิชีวนะ kanamycin และเจริญเติบโตเป็นต้น putative transgenic ต้นใหม่ได้ในที่สุด

ต้น transgenic ที่ได้ผ่านการตรวจสอบแล้วว่าได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างของยีนเป้าหมายเข้าไป จะถูกนำไปเปลี่ยนอาหาร เพิ่มจำนวนต้น transgenic เพื่อเตรียมพร้อมที่จะเข้าสู่กระบวนการตรวจสอบด้วยกรรมวิธีเพิ่มเติม และนำออกปลูกลงในแปลงทดลองเพื่อตรวจสอบฟิโนไทป์ที่แท้จริงในขั้นตอนต่อไป แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการเปลี่ยนอาหาร ส่งผลให้เกิดการหายไปของโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมายที่เคยถูกถ่ายโอนเข้าสู่พืชไปแล้ว ยกตัวอย่างเช่น transgenic line AL-1-1 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeEXO3 ซึ่งหลังจากผ่านการตรวจสอบครั้งแรกสามารถยืนยันได้ว่าต้นดังกล่าวเป็น transgenic แต่เมื่อผ่านการเปลี่ยนอาหาร ครั้งที่ 1 โดยแยก transgenic line AL-1-1 ออกเป็น 5 line ย่อย พบว่ามีแค่เพียง 3 line ย่อยเท่านั้นที่มีผลปฏิกิริยาถูกโซ่เป็นบวก และเมื่อเปลี่ยนอาหาร อีกครั้งโดยแบ่งออกเป็น 10 line ย่อย พบว่าผลปฏิกิริยาถูกโซ่ของ line ย่อยทุก line เป็นลบทั้งหมด (ภาพผนวกที่ 11) เหตุการณ์ที่เกิดขึ้นดังกล่าวอาจจะเป็นผลมาจากกระบวนการถ่ายโอนโครงสร้างยีน ที่มีการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อพืชแค่เพียงบางเซลล์ ทำให้เมื่อเกิดการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ (regeneration) ส่งผลให้ต้นพืชต้นใหม่มีลักษณะเป็น chimera คือเป็นต้น transgenic ที่ไม่สมบูรณ์มีเพียงบางส่วนของพืชเท่านั้นที่มีเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน (Faize *et al.*, 2010) เนื่องจากกระบวนการ regenerate ของมันฝรั่งหลังการถ่ายโอนยีนนั้นผ่านกระบวนการ organogenesis ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะก่อให้เกิด chimera ในต้น transgenic ที่ได้ และเมื่อทำการเปลี่ยนอาหาร ต้น transgenic ดังกล่าวจึงส่งผลให้มีบางต้นเกิดการหายไปของ

โครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมาย การเกิด chimera จะพบได้บ่อยในการถ่ายโอนยีนของพืชจำพวกไม้ล้มลุก (herbaceous species) เช่น ยาสูบ ถั่วเหลือง และ ข้าว เป็นต้น (Christou, 1990; Schmulling and Schell, 1993; Christou, 1990) ซึ่งมันฝรั่งเป็นหนึ่งในพืชล้มลุกที่พบการเกิด chimera ได้บ่อยเช่นกัน (Rakosy-Tican *et al.*, 2007) เหตุผลสำคัญที่น่าจะทำให้เกิด chimera ขึ้นน่าจะเกิดจากการชักนำให้เกิดยอกจากเซลล์หลายเซลล์ (Poethig, 1989) กล่าวคือหากการชักนำให้เกิดต้นใหม่เกิดจากการชักนำมาจากเซลล์แค่เพียงเซลล์เดียวก็จะง่ายต่อการจำแนกว่า ต้นใดเป็น transgenic ต้นใดไม่ใช่ transgenic เนื่องจากหากต้นที่ถูกชักนำมาจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเพียงเซลล์เดียวต้นนั้นก็จะเป็นต้น transgenic อย่างแท้จริง แต่ถ้าหากการชักนำให้เกิดต้นใหม่เกิดจากการรวมกันของหลายเซลล์ซึ่งปะปนไปด้วยเซลล์ที่ได้รับ และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน จะส่งผลทำให้ต้นใหม่ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น chimera นอกจากนี้การเกิดข้อผิดพลาดของการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนใน putative transgenic อาจจะทำให้มีการคัดเลือกราก transgenic ที่ไม่มีการแทรกของโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมายอยู่จริง หรือเกิดผลบวกหลวง (false positive) ผลที่เกิดขึ้นดังกล่าวอาจจะเกิดจากกระบวนการถ่ายโอนยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* โดยหลังผ่านกระบวนการถ่ายโอนยีนแบคทีเรีย *Agrobacterium* ที่มีโครงสร้างยีนเป้าหมายอาจจะเกิดการเคลื่อนที่เล็ดลอดไปอาศัยอยู่ในเซลล์อื่นของพืชโดยไม่ได้นุกรุกถ่ายโอนโครงสร้างยีนเป้าหมายเข้าไปในเซลล์ (Cubero and Lopez, 2004) การเล็ดลอดของ *Agrobacterium* พบได้ในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในองุ่น และอาจพบได้ในพืชล้มลุกบางชนิด รายงานของ Potrykus ในปี 1990 ได้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่ *Agrobacterium* สามารถที่จะมีการแสดงออกของยีนในเซลล์ที่แบคทีเรียหลุดลอดเข้าไป และยังคงอาศัยอยู่ในเซลล์ต่อไปได้แม้พืชจะผ่านการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่แล้วก็ตาม ซึ่งเป็นเหตุผลหลักที่ทำให้เกิดผลบวกหลวงของการตรวจสอบ transgene ในพืชหลังจากผ่านกระบวนการถ่ายโอนยีน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะพบผลบวกหลวงในมันฝรั่งที่ผ่านการถ่ายโอนยีนด้วย *Agrobacterium* ซึ่งเกิดมาจากการเล็ดลอดของ *Agrobacterium* ที่มีโครงสร้างยีนเป้าหมายในเซลล์พืช และเมื่อผ่านการเปลี่ยนอาหาร ของต้นมันฝรั่งดังกล่าวทำให้พบว่าการหายไปของโครงสร้างยีนเป้าหมาย อีกหนึ่งสาเหตุสำคัญที่ทำให้ในต้น transgenic ที่ผ่านการตรวจสอบซ้ำด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่แล้วพบว่ามีผลเป็นลบ คือความไม่เสถียรของยีนที่ถูกถ่ายโอนเข้าไปในพืช (transgene instability) ซึ่งส่งผลให้เกิดการหลุดหายไปของยีนที่ถูกถ่ายโอนระหว่างที่พืชกำลังเจริญเติบโต หรือทำให้ยีนที่ถูกถ่ายโอนเข้าไปในพืชไม่สามารถแสดงออกได้ (Tizaoui and Kchouk, 2012) ความไม่เสถียรดังกล่าวเกิดได้จากหลายปัจจัย โดยอาจจะเกิดจากกระบวนการต่อต้านยีนแปลกปลอมของจีโนมพืชทำให้เกิดกลไกกำจัดยีนที่ถ่ายโอนเข้าสู่พืชออกไป (Ahuja, 1997) หรืออาจจะเกิดจากความไม่เสถียรของโครงสร้างพลาสมิดที่แทรกเข้าไปในพืชเอง ทำให้เมื่อเวลาผ่านไปเกิดการแยกตัวออกมาจากจีโนมพืชและเกิดการหายไปของยีน (Lee, 2004) มีหลายรายงานได้

ชี้ให้เห็นว่าจำนวนซ้ำของยีน ตำแหน่งแทรกของยีน และความคล้ายของยีนที่ถ่ายโอนกับยีนในจีโนมของพืช ส่งผลต่อความไม่เสถียรของยีนที่ถ่ายโอนในพืชเช่นกัน ซึ่งเหตุการณ์เหล่านี้จะกระตุ้นกระบวนการหยุดการแสดงออกของยีน (gene silencing) ทำให้ยีนที่ถ่ายโอนเข้าไปลดระดับการแสดงออกลง (Matzke and Matzke, 1998; Kohli *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2004) แต่อย่างไรก็ตาม การหยุดการแสดงออกของยีนไม่มีผลกระทบต่อการแทรกของยีนในจีโนมของพืช นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าความไม่เสถียรของยีนเกิดจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น อุณหภูมิ และน้ำ เป็นต้น (Broer, 1996) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ปัจจัยต่างๆเหล่านี้จะเกิดขึ้น แล้วส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรของยีนที่แทรกอยู่ในจีโนมของ transgenic ทำให้เกิดการหลุดหายไปของยีนเป้าหมายในที่สุด

การเกิด chimera การเล็ดลอดของแบคทีเรีย *Agrobacterium* และความไม่เสถียรของยีนที่ถูกถ่ายโอน เป็นข้อผิดพลาดที่มีโอกาสพบได้ในกระบวนการถ่ายโอนยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* นอกจากนี้การถ่ายโอนยีนด้วยวิธีดังกล่าวยังพบว่ามีโอกาสที่จะเกิดการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิดหลายซ้ำเข้าไปในพืช (De Buck *et al.*, 2009) ทำให้เกิดการแทรกของยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมของพืชมากกว่า 1 ชุด ซึ่งมีรายงานว่า การแทรกของยีนที่ถ่ายโอนในจีโนมพืชหลายชุด ส่งผลให้เกิดกระบวนการหยุดการแสดงออกของยีนที่ถ่ายโอนเข้าไปได้ (Schubert *et al.*, 2004) ทำให้ไม่สามารถติดตามผลกระทบของยีนต่อลักษณะฟีโนไทป์ของพืชได้ แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสไม่สามารถตรวจสอบจำนวนชุดยีนที่แทรกเข้าสู่จีโนมพืชได้ ดังนั้นจึงต้องนำกรรมวิธี Southern blot ซึ่งเป็นวิธีการติดตามยีนเป้าหมายโดยอาศัยการติดตามของฉลาก (probe) ที่สร้างให้จำเพาะกับยีนเป้าหมาย เพื่อตรวจสอบจำนวนชุดของยีน และยังสามารถที่จะยืนยันได้ว่าการแทรกของยีนเข้าไปในจีโนมพืชจริง ทำให้สามารถคัดค้น transgenic ที่มีผลบวกลงจากการเล็ดลอดของแบคทีเรีย *Agrobacterium* ได้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Southern blot ใน transgenic line มี transgenic line จำนวน 2 line ที่พบการแทรกของยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมพืช คือ line AQ-2-5 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeAVP_1 (ภาพที่ 52ก) พบการแทรกของโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมายมากกว่า 3 ชุด และ line AR-2-1 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO1 (ภาพที่ 53ก) พบการแทรกของโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมายมากกว่า 3 ชุดเช่นกัน ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าทั้ง 2 line มีการแทรกของโครงสร้างยีนเป้าหมายในจีโนมของพืชอยู่จริง นอกจากนี้เมื่อผ่านการเปลี่ยนอาหาร และตรวจซ้ำของ transgenic line ดังกล่าว พบว่าในทุก line ย่อยมีผลปฏิกิริยาเป็นบวกทั้งหมด ซึ่งเป็นเพราะว่าทั้ง 2 line มีการแทรกของยีนในจีโนมอยู่จริงและ transgene ยังมีความเสถียรใน line เหล่านี้ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะมีการแทรกตัวมากกว่า 1 copy ทำให้ในทุก line ย่อยยังคงมีโครงสร้างของยีน

เป้าหมายอยู่ในจีโนม แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 2 line มีจำนวนชุดของยีนที่แทรกอยู่ในจีโนมในปริมาณสูง โดยที่ผ่านมามีการรายงานว่าจำนวนชุดซ้ำของยีนเป้าหมายที่แทรกเข้าไปในจีโนมพืช อาจส่งผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ถ่ายโอนเข้าไปในพืช (Schubert *et al.*, 2004) ซึ่งมีหลายรายงานที่แสดงให้เห็นว่าจำนวนซ้ำของยีนที่แทรกในจีโนมพืชในปริมาณมาก มีผลเกี่ยวข้องกับกระบวนการหยุดการแสดงออก (gene silencing) ของยีนที่ถ่ายโอนเข้าไปสู่พืช (Hobbs *et al.*, 1990; Jorgensen *et al.*, 1996; Que *et al.*, 1997) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ transgenic line ทั้ง 2 line จะเกิดกระบวนการหยุดการแสดงออกจากการกระตุ้นของจำนวนชุดซ้ำของยีนที่มีจำนวนมาก เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย transgenic line ทั้ง 2 line จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR แต่เนื่องจากทั้ง 2 line เป็น transgenic line ที่มีโครงสร้างพลาสมิดของยีนเป้าหมายที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ patatin ซึ่งจะมีการแสดงออกเฉพาะในอวัยวะสะสมอาหารของพืช ดังนั้นการตรวจสอบการแสดงออกของยีนจึงต้องตรวจสอบจากหัวของมันฝรั่ง ด้วยเหตุนี้ transgenic line ทั้ง 2 line ต้องผ่านกระบวนการทดสอบฟีโนไทป์และกระตุ้นการสร้างหัวสะสมอาหาร (tuberization) เสียก่อน เพื่อที่จะนำหัวสะสมอาหารมาศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR ต่อไป

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการติดตามการแสดงออกของยีนเป้าหมายในต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเป้าหมายเข้าไป ซึ่งกระบวนการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญ เพราะหากต้น transgenic ที่มีการรับยีนเป้าหมายที่ถ่ายโอนเข้าไปแล้ว แต่ยีนดังกล่าวไม่สามารถที่จะแสดงออกในพืชได้ ก็จะทำให้ไม่สามารถติดตามผลกระทบของยีนต่อลักษณะการเปลี่ยนแปลงของพืชได้ จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป้าหมายใน transgenic line ที่ผ่านการตรวจสอบยืนยันการมีอยู่ของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แล้ว พบว่า transgenic line AM-1-9 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeMRBI มีการแสดงออกของยีน MeMRBI ในพืช (ภาพที่ 54ค) แต่อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์ transgenic line ดังกล่าวด้วยวิธี Southern Blot ยังคงไม่พบการแทรกของยีนเป้าหมายในจีโนมของ transgenic ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า transgenic line ดังกล่าวอาจมีลักษณะเป็น chimera หรืออาจเกิดความไม่เสถียรของยีนที่ถ่ายโอนเข้าไปทำให้เกิดการสูญหายไปของยีน ดังนั้นเมื่อศึกษาด้วยวิธี Southern blot หลังจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนจึงมีโอกาที่ยีนที่ถ่ายโอนเข้าไปจะสูญหายไปจาก transgenic line ดังกล่าว

การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ภายในขอบเขตเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถติดตามผลกระทบของยีนเป้าหมายต่อการเจริญเติบโตของต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม เป้าหมายได้ในเบื้องต้น ซึ่งลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจะถูกเปรียบเทียบกับต้นมันฝรั่ง wild-type ที่ไม่ผ่านการถ่ายโอนยีน จากการศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของ transgenic line ที่มีการแทรกของยีนเป้าหมายในจีโนมของ transgenic ซึ่งผ่านการยืนยันด้วยวิธี Southern blot มีการแทรกของยีนอยู่จริง คือใน line AQ-2-5 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeAVP_1 และ line AR-2-1 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO1 เมื่อเปรียบเทียบของลักษณะของต้นภายในขอบเขตเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 55) พบว่าไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงลักษณะของต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ของทั้งสอง line อย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นเพราะทั้งสอง line อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ patatin ซึ่งจะมีการแสดงออกจำเพาะที่อวัยวะสะสมอาหาร ดังนั้นอาจจะต้องนำ transgenic ทั้งสอง line รวมถึงต้นมันฝรั่ง wild-type ที่ใช้เป็นชุดควบคุม (control) ไปเข้าสู่กระบวนการชักนำให้เกิดการสร้างหัวสะสมอาหารเสียก่อน จึงจะสามารถเปรียบเทียบลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปได้อย่างชัดเจน ส่วนใน transgenic line AM-1-9 ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeMRB1 ที่พบการแสดงออกของยีน MeMRB1 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะฟีโนไทป์เทียบกับต้นมันฝรั่งที่ไม่ผ่านการถ่ายโอนยีนภายในขอบเขตเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 55) ยังคงไม่พบความแตกต่างอย่างแน่ชัดของลักษณะฟีโนไทป์ภายในขอบเขตเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะสภาวะภายในขอบเขตเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจจะทำให้การเจริญเติบโตของพืชไม่มีความชัดเจน ดังนั้นเพื่อจะติดตามลักษณะที่ชัดเจนจำเป็นต้องนำ line ดังกล่าวออกปลูกสู่แปลงทดลองเพื่อติดตามลักษณะฟีโนไทป์ของต้นพืชในสภาวะจริง เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างที่อาจมีความชัดเจนมากขึ้นกับต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้ถูกถ่ายโอนยีน แต่อย่างไรก็ตามจากการสังเกตลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจจะไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างได้ ดังนั้นจะต้องศึกษาเพิ่มเติมในการวัดค่าตัวแปรอื่นๆ อย่างเช่น การวัดค่าน้ำหนักสดหรือน้ำหนักแห้งของส่วน ราก ลำต้น ใบ และอวัยวะสะสมอาหาร เพื่อการตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงอย่างแน่ชัด หรือการศึกษาลักษณะและจำนวนของเซลล์พืชเพื่อให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ว่ายีนเป้าหมายส่งผลอย่างไรต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ซึ่งจากค่าตัวแปรเหล่านี้จะสามารถที่จะสรุปผลกระทบของยีนต่อการเจริญเติบโตของต้น transgenic ได้อย่างแท้จริง

ถึงแม้ว่าการตรวจสอบวิเคราะห์ต้น putative transgenic จะไม่สามารถตรวจสอบครอบคลุมต้น putative transgenic ได้ทุกต้น แต่การตรวจสอบด้วยกรรมวิธีการต่างๆทำให้สามารถระบุต้น transgenic ที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนของยีนเป้าหมายได้จำนวนหนึ่ง ซึ่งต้น transgenic ที่สามารถระบุได้ทั้งหมด จะผ่านการตรวจซ้ำและยืนยันเพื่อให้แน่ใจว่าต้น transgenic ดังกล่าวมีการแทรกของยีนเป้าหมายอยู่จริง ก่อนที่จะนำไปสู่การปลูกแปลงทดสอบเพื่อให้เห็นในสภาวะจริงว่ายีนเป้าหมายที่ต้นมันฝรั่งได้รับเข้าไปนั้น ส่งผลกระทบอย่างไรต่อกระบวนการเจริญเติบโต และพัฒนาสร้างอวัยวะสะสมอาหารของพืช ซึ่งลักษณะที่เปลี่ยนแปลงสามารถที่จะนำมารวบรวมวิเคราะห์แล้วสรุปเป็นองค์ความรู้ของยีนกลุ่มเป้าหมายดังกล่าวต่อกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาการสะสมอาหารของมันสำปะหลังต่อไป

จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า การถ่ายโอนยีนเป้าหมายจากมันสำปะหลังเข้าสู่มันฝรั่งสามารถทำได้จริง ซึ่งสามารถติดตามให้ทราบได้จากกระบวนการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ และสามารถศึกษาได้จากจีโนมไทป์ในต้น transgenic ด้วยการวิเคราะห์จำนวนชุดซ้ำของยีนที่ถูกถ่ายโอนเข้าสู่ต้นมันฝรั่ง พบว่ามีการส่งถ่ายยีนจากมันสำปะหลังเข้าไปแทรกในจีโนมของมันฝรั่งอยู่จริง และการพบการแสดงออกของยีนทำให้สามารถยืนยันได้ว่าการถ่ายโอนยีนเป้าหมายจากมันสำปะหลังสามารถที่จะแสดงออกได้ในมันฝรั่ง ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปวิเคราะห์ประกอบกับผลที่ได้จากการประเมินลักษณะฟีโนไทป์ต่อไป แต่อย่างไรก็ตามปัญหาของการถ่ายโอนยีนที่ส่งผลให้ต้น transgenic บางต้นเกิดลักษณะเป็น chimera หรือพบการเล็ดลอดของ *Agrobacterium* รวมถึงการเกิดความไม่เสถียรของยีนเป้าหมายขึ้น เป็นปัญหาสำคัญในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่มันฝรั่ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าต้องใช้การตรวจวิเคราะห์ต้น transgenic อย่างละเอียดเพื่อให้ได้ต้นที่เป็น transgenic ที่มียีนเป้าหมายในจีโนมพืชอยู่จริง

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลังเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารอย่างหนึ่ง คือปัจจัยจากกลไกการควบคุมของยีน เพื่อที่จะเข้าใจโครงข่ายของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง กลุ่มยีน *AVP1 EXO* และ *MRB1* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่มีบทบาทในการควบคุมขนาดของอวัยวะของพืช จึงถูกเลือกมาเพื่อศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีนต่อกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง โดยการศึกษาจะทำการคัดเลือกและโคลนแยกยีนคู่เหมือนของกลุ่มยีน *AVP1 EXO* และ *MRB1* ที่อยู่ในจีโนมของมันสำปะหลัง เพื่อสร้างพาหะถ่ายโอนยีนเป้าหมายเข้าสู่พืชต้นแบบมันฝรั่ง สำหรับใช้ศึกษาหน้าที่ของยีนดังกล่าวต่อกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาอวัยวะสะสมอาหารในพืช ซึ่งผลการดำเนินการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. การวิเคราะห์จำแนก และคัดเลือกลำดับยีนเป้าหมาย *AVP1 EXO* และ *MRB1* ในมันสำปะหลัง

การจำแนกยีนคู่เหมือน *AVP1* ในจีโนมมันสำปะหลังด้วยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างโปรตีน ร่วมกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของยีน ทำให้เห็นว่ายีนที่อยู่ในแขนงวิวัฒนาการเดียวกันกับยีนต้นแบบ *AtAVP1* จากต้น *Arabidopsis* จำนวน 5 ยีน ซึ่งยังคงรักษาโครงสร้างโปรตีนที่สำคัญต่อการทำหน้าที่ของโปรตีน H^+ -PPase ที่ทำการขนส่งโปรตอนเข้าสู่แวคิวโอลโดยใช้พลังงานจากการสลาย PPi ทำให้เกิดกระบวนการขนส่งออกซินในพืช และเมื่อนำกลุ่มยีนดังกล่าวไปศึกษาวิเคราะห์ด้วยการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมันสำปะหลัง ทำให้สามารถจำแนกยีนเป้าหมายในมันสำปะหลัง 2 ยีน คือยีน *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* ที่มีการแสดงออกสูงในรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังที่มีอายุน้อย โดยเฉพาะในระยะที่รากเริ่มมีการโป่งพอง ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายีนทั้งสองน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเริ่มพัฒนาของรากสะสมอาหาร ผ่านการกระตุ้นการขนส่งฮอร์โมนออกซินในเซลล์พืช

ส่วนในกรณีของยีน *EXO* การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการสามารถแยกกลุ่มของยีน *EXO* ในมันสำปะหลังจำนวน 5 ยีน ที่อยู่ในแขนงเดียวกันกับยีน *AtEXO* จากต้น *Arabidopsis* ได้อย่างชัดเจน ซึ่งเมื่อพิจารณาผลเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนชี้ให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนมีการอนุรักษ์สูง และมีการอนุรักษ์ลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญต่อหน้าที่ของโปรตีนเอาไว้ และเมื่อวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีนชี้ให้เห็นว่ามีบางยีนที่ยังคงรักษาการแสดงออกของโปรตีนที่เป็น extracellular protein ของยีนเอาไว้รวมถึงยีน *MeEXO1* และ *MeEXO3* ซึ่งจากการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของทั้งสองยีนพบที่มีการแสดงออกที่สูงในรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังในช่วงอายุที่มีการเจริญเติบโตสูง โดยเฉพาะ *MeEXO3* ที่มีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อ parenchyma ที่เป็นบริเวณสะสมอาหารของรากมันสำปะหลัง นอกจากนี้การรายงานถึงเกี่ยวข้องของการแสดงออกของยีนกับการส่งสัญญาณของ brassinosteroids แสดงให้เห็นว่ายีนทั้งสองอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการขยายขนาดของรากสะสมอาหาร ซึ่งตอบสนองจากการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของ brassinosteroids

การจำแนกยีนคู่เหมือนที่เป็นเป้าหมายในการศึกษาหน้าที่ของยีนในกลุ่มยีน *MRB1* ของมันสำปะหลัง พบว่ามีเพียง 2 ยีน เท่านั้นคือยีน *MeMRB1_1* และ *MeMRB1_2* ที่ถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในแขนงเดียวกันกับยีนต้นแบบ *AtMRB1* ของต้น *Arabidopsis* ในแผนภูมิต้นไม้แสดงวิวัฒนาการของกลุ่มยีน *MRB1* เมื่อพิจารณาผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนรวมถึงการศึกษา transmembrane domain ของทั้งสองยีนกับยีน *AtMRB1* แสดงให้เห็นว่ามีเฉพาะยีน *MeMRB1_1* ที่ยังคงรักษาโครงสร้างโปรตีนที่ใกล้เคียงกับยีน *AtMRB1* เมื่อศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีน *MeMRB1_1* ในเนื้อเยื่อของมันสำปะหลังแสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อ parenchyma และในรากที่เริ่มมีการโป่งพอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *MeMRB1_1* น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของรากสะสมอาหาร และการเกิดรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง

จากการศึกษาข้างต้นทำให้สามารถจำแนกยีนคู่เหมือนที่น่าจะมีโครงสร้างและหน้าที่ใกล้เคียงกับยีนต้นแบบจากต้น *Arabidopsis* จำนวน 5 ยีนประกอบด้วยกลุ่มยีน *AVP1* จำนวน 2 ยีน คือ *MeAVP1_1* และ *MeAVP1_2* กลุ่มยีน *EXO* จำนวน 2 ยีน คือ *MeEXO1* และ *MeEXO3* และกลุ่มยีน *MRB1* มีเพียงยีน *MeMRB1_1* ที่ให้ชื่อใหม่เป็น *MeMRB1*

2. การศึกษาหน้าที่ของยีนผ่านการวิเคราะห์ต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม

ยีนเป้าหมายทั้ง 5 ยีนถูกนำไปสร้างโครงสร้างพลาสมิดเพื่อใช้ในการถ่ายโอนยีน ซึ่งการแสดงออกของยีนถูกควบคุมอยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ 2 ชนิด คือ โปรโมเตอร์ 35S ซึ่งจะทำการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์นี้มีการแสดงออกของยีนในปริมาณสูง และโปรโมเตอร์ *patatin* ที่สามารถควบคุมการแสดงออกให้จำเพาะอวัยวะสะสมอาหารได้ ทำให้สามารถศึกษาหน้าที่ของยีนต่อการเจริญเติบโตโดยรวม และจำเพาะกับอวัยวะสะสมอาหารได้ตามลำดับ ซึ่งโครงสร้างพลาสมิดทั้งหมดถูกถ่ายโอนเข้าสู่พืชแม่แบบมันฝรั่งเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนผ่านการถ่ายโอนด้วยแบคทีเรีย *Agrobacterium*

ต้น putative transgenic ทั้งหมดได้รับการตรวจสอบเพื่อยืนยันการมีอยู่ของยีนด้วยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เชนจากคู่ไพรเมอร์ 2 คู่ ซึ่งต้น putative transgenic ที่มีผลปฏิกิริยาถูกใช้ของทั้งสองคู่ไพรเมอร์เป็นบวกเหมือนกัน แสดงว่าเป็นต้น transgenic ที่ได้รับโครงสร้างพลาสมิดที่มียีนเป้าหมายเข้าไป ซึ่งต้น transgenic ถูกนำไปตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาถูกใช้ซ้ำ และถูกนำไปวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยกรรมวิธีอื่น คือการตรวจจำนวนซ้ำของยีนด้วยวิธี Southern blot ซึ่งพบต้น transgenic จำนวน 2 line คือ line AQ-2-5 ของโครงสร้างพลาสมิด *pBI121:pat::MeAVP_1* และ line AR-2-1 ของโครงสร้างพลาสมิด *pBI121:pat::MeEXO1* ที่มีการแทรกของยีนเข้าสู่จีโนมของ transgenic มากกว่า 3 ชุดเช่นกัน นอกจากนี้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนเป้าหมายในต้น transgenic ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR ยังพบการแสดงออกของยีนในต้น transgenic line อื่นอีก 1 line คือ AM-1-9 ของโครงสร้างพลาสมิด *pBI121:35S::MeMRB1* โดย transgenic line ทั้งหมดจะผ่านการเปลี่ยนอาหาร และตรวจสอบซ้ำด้วยปฏิกิริยาถูกใช้ เพื่อเพิ่มจำนวนและยืนยันว่ามีการถ่ายโอนของยีนเข้าสู่ต้น transgenic line นั้นจริง แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบซ้ำของต้น transgenic ทำให้พบว่าการหายไปของโครงสร้างยีนเป้าหมายในบาง line ซึ่งอาจจะเกิดจากเหตุที่ต้น transgenic เหล่านั้นมีลักษณะเป็น chimera หรือเกิดจากผลบวกของปฏิกิริยาถูกใช้จากการเล็ดลอดของแบคทีเรีย *Agrobacterium* หรืออาจจะเกิดจากความไม่เสถียรของยีนที่ถูกถ่ายโอนเข้าสู่พืชทำให้เกิดสูญหายไปของยีน

สำหรับต้น transgenic ที่ผ่านการตรวจสอบซ้ำและยืนยันจนแน่ใจแล้วว่าเป็นต้น transgenic ที่แท้จริง จะถูกนำไปปลูกในแปลงทดลองเพื่อติดตามผลกระทบของยีนเป้าหมายต่อกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาอวัยวะสะสมอาหารต่อไป ซึ่งคาดหวังว่าจะสามารถนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ของโครงข่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างรากสะสมอาหารในมันสำปะหลังที่มีความซับซ้อนได้ในอนาคต เพื่อเป็นประโยชน์ในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำของระบบการปรับปรุงสายพันธุ์มันสำปะหลัง ให้สามารถสร้างรากสะสมอาหารขนาดใหญ่ เพื่อรองรับต่อการใช้ประโยชน์ได้อย่างเป็นรูปธรรมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้สามารถที่จะสร้างและถ่ายโอนพาหะถ่ายโอนยีนเป้าหมายกลุ่ม *AVP1 EXO* และ *MRB1* จากมันสำปะหลัง เข้าสู่มันฝรั่งได้สำเร็จ ซึ่งยีนกลุ่มนี้มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยมีผลตอบสนองกับระดับฮอร์โมนในพืชอีกด้วย ดังเช่นในรายงานของยีน *AVP1* ที่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนออกซิน และยีน *EXO* ที่มีการตอบสนองต่อระดับของ brassinasteroid ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของระดับฮอร์โมนต่อการแสดงออกของยีนกลุ่มเป้าหมาย *AVP1 EXO* และ *MRB1* ในมันสำปะหลัง น่าจะทำให้เข้าใจกลไกการทำงานของยีนต่อการควบคุมการเจริญเติบโตในมันสำปะหลังได้มากขึ้น

จากการศึกษาหน้าที่ของยีนผ่านการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชมันฝรั่ง ทำให้พบว่ากระบวนการถ่ายโอนยีนเกิดปัญหาการสูญหายไปของยีนหลังการเปลี่ยนอาหาร ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญต่อการศึกษาและคัดเลือกดั้ง transgenic ทำให้ได้ต้น transgenic ที่ไม่มียีนแทรกในจีโนมอยู่จริง เพื่อลดปัญหาดังกล่าวกระบวนการวิเคราะห์และคัดเลือกจึงต้องมีความละเอียดมากขึ้น อาจจะเพิ่มการยืนยันปฏิกิริยาถูกใส่ด้วยคู่มือเมอร์มากกว่า 2 คู่ เพื่อให้แน่ใจว่ามีโครงสร้างพลาสมิดเป้าหมายอยู่จริง หรืออาจจะปรับกระบวนการถ่ายโอนยีนให้มีประสิทธิภาพที่มากขึ้น เพื่อลดปัญหาการสูญหายของยีนในต้น transgenic หลังการเปลี่ยนอาหาร ส่วนในขั้นตอนการประเมินลักษณะฟีโนไทป์ของพืช เพื่อให้เข้าใจถึงผลกระทบจากการแสดงออกของยีนต่อต้น transgenic อาจจะต้องเพิ่มตัวแปรวัดผลอื่นๆ เช่น การเปรียบเทียบน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในแต่ละส่วนของต้น transgenic กับ wild-type หรือการศึกษาลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นต้น เพื่อให้เห็นถึงความแตกต่างที่เปลี่ยนแปลงไปของต้น transgenic ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้การสร้าง transgenic line ในปริมาณที่มากขึ้นของแต่ละโครงสร้างยีนเป้าหมายเพื่อนำไปใช้ในการประเมินลักษณะฟีโนไทป์ จะทำให้ข้อมูลที่ได้มีความถูกต้องมากกว่าการวิเคราะห์ลักษณะฟีโนไทป์จาก

transgenic เพียงแค่ line เดียว หรือ 2 line และสำหรับ transgenic line ที่มีโครงสร้างยีนเป้าหมายที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ patatin อาจจะต้องนำไปผ่านกระบวนการกระตุ้นการสร้างหัวสะสมอาหาร (in vitro tuberization) เพื่อตรวจสอบลักษณะของอวัยวะสะสมอาหารที่เปลี่ยนแปลงไปภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อ เทียบกับต้น wild type ก่อนที่จะนำออกปลูกและประเมินฟิโนไทป์ต่อไป แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาหน้าที่ของยีนเป้าหมายจากมันสำปะหลังในระบบมันฝรั่ง อาจจะสามารถสร้างความรู้ของยีนต่อกลไกการสร้างอวัยวะสะสมอาหารในมันสำปะหลังได้เพียงแค่บางส่วน เนื่องจากประเภทของอวัยวะสะสมอาหารของพืชสองชนิดต่างกัน ดังนั้นในอนาคตยีนเป้าหมายกลุ่มนี้จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่มันสำปะหลังเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนในมันสำปะหลังโดยตรง เพื่อสร้างองค์ความรู้ของยีนเป้าหมายเหล่านี้ต่อกลไกการพัฒนารากสะสมอาหารในมันสำปะหลังได้อย่างสมบูรณ์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2557. **Cassava.**

แหล่งที่มา: <http://agri.kps.ku.ac.th/agron/file/cassava.pdf>, 20 สิงหาคม 2557.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. **สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2557.** 186 หน้า.

Adeniji, A.A., L.A. Ega, M.O. Akoroda, A.A. Adeniyi, B.O. Ugwu and A. de Balogun. 2005.

Cassava Development in Nigeria. (Electronicbook). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Ahuja, M.R. 1997. Transgenes and genetic instability, pp. 90-100. In N. B. Klopfenstein, Y. W. Chun, M.-S. Kim and M. R. Ahuja, eds. **Micropropagation, Genetic Engineering and Molecular Biology of Populus.** Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, Fort Collins.

Aleves, A.A.C. 2002. Cassava botany and physiology, pp. 67-89. In R. J. Hillock, J. M. Tresh and A. C. Belloti, eds. **Cassava biology production and utilization.** CABI, Wallingford, UK.

Allem, A.C. 1994. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Genet. Resour. Crop Ev.** 41: 133-150.

Azpiroz, R., Y. Wu, J.C. LoCascio and K.A. Feldmann. 1998. An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. **Plant Cell** 10 (2): 219-230.

Binns, A.N. and M.F. Thomashow. 1988. Cell biology of *Agrobacterium* Infection and transformation of plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 42 (1): 575-606.

- Bouchez, D. and H. Hofte. 1998. Functional genomics in plants. **Plant Physiol.** 118 (3): 725-732.
- Brent, R. 2000. Genomic biology. **Cell** 100 (1): 169-183.
- Broer, I. 1996. Stress inactivation of foreign genes in transgenic plants. **Field Crops Research** 45 (1-3): 19-25.
- Ceballos, H., P. Kulakow and C. Hershey. 2012. Cassava breeding: current status, bottlenecks and the potential of biotechnology tools. **Trop. Plant Biol.** 5: 73-87.
- Cho, H.T. and D.J. Cosgrove. 2000. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 97 (17): 9783-9788.
- Choe, S., B.P. Dilkes, S. Fujioka, S. Takatsuto, A. Sakurai and K.A. Feldmann. 1998. The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22alpha-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. **Plant Cell** 10 (2): 231-243.
- Christie, P.J., K. Atmakuri, V. Krishnamoorthy, S. Jakubowski and E. Cascales. 2005. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. **Annu. Rev. Microbiol.** 59: 451-485.
- Christou, P. 1990. Morphological description of transgenic soybean chimeras created by the delivery, integration and expression of foreign DNA using electric discharge particle acceleration. **Ann. Bot.** 66: 379-386.
- Cock, J.H. and S. Rosas. 1975. Ecophysiology of cassava, pp. 1-14. *In*, eds. **Symposium on Ecophysiology of Tropical Crops**. Communications Division of CEPLAC, Ilheus, Bahia, Brazil.

- Coll-Garcia, D., J. Mazuch, T. Altmann and C. Mussig. 2004. EXORDIUM regulates brassinosteroid-responsive genes. **FEBS Lett.** 563 (1-3): 82-86.
- Cosgrove, D.J. 2005. Growth of the plant cell wall. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 6 (11): 850-861.
- Coyle, E.D. and R.A. Simmons. 2014. **Understanding the Global Energy Crisis.** Purdue University Press.
- Cubero, J. and M. López. 2004. *Agrobacterium* persistence in plant tissues after transformation, pp. 351-363. in L. Peña, eds. **Transgenic Plants: Methods and Protocols.** Humana Press.
- Dhairyasheel, D.P. 2008. **Understanding the genetic basis of storage root formation along with starch and betacarotene biosynthesis and their inter-relation in Sweetpotato (*Ipomoea batatas* LAM.)** Doctoral, University of Natural Resources and Life Sciences.
- De Buck, S., N. Podevin, J. Nolf, A. Jacobs and A. Depicker. 2009. The T-DNA integration pattern in *Arabidopsis* transformants is highly determined by the transformed target cell. **Plant J.** 60 (1): 134-145.
- Deprost, D., L. Yao, R. Sormani, M. Moreau, G. Leterreux, M. Nicolai, M. Bedu, C. Robaglia and C. Meyer. 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. **EMBO Rep.** 8 (9): 864-870.
- Domínguez, A., M. Cervera, R. Pérez, J. Romero, C. Fagoaga, J. Cubero, M. López, J. Juárez, L. Navarro and L. Peña. 2004. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Mol. Breed.** 14 (2): 171-183.

- Drozdowicz, Y.M., J.C. Kissinger and P.A. Rea. 2000. *AVP2*, a sequence-divergent, K(+)-insensitive H(+)-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 123 (1): 353-362.
- Durrenberger, F., A. Crameri, B. Hohn and Z. Koukolikova-Nicola. 1989. Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 86 (23): 9154-9158.
- El-Sharkawy, M.A. 2004. Cassava biology and physiology. **Plant Mol. Biol.** 56 (4): 481-501.
- Faize, M., L. Faize and L. Burgos. 2010. Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. **BMC Biotechnol.** 10 (1): 53.
- Farrar, K., I.M. Evans, J.F. Topping, M.A. Souter, J.E. Nielsen and K. Lindsey. 2003. EXORDIUM a gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in *Arabidopsis*. **Plant J.** 33 (1): 61-73.
- Fernie, A.R. and L. Willmitzer. 2001. Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. **Plant Physiol.** 127 (4): 1459-1465.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. **The Statistics Division of the FAO** Available Source: <http://faostat.fao.org/>, July 20, 2014.
- Franck, A., H. Guilley, G. Jonard, K. Richards and L. Hirth. 1980. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. **Cell** 21 (1): 285-294.
- Fregene, M. and J. Puonti-Kaerlas. 2002. Cassava Biotechnology, pp. 179-207. In R. J. Hillock, J. M. Tresh and A. C. Belloti, eds. **Cassava biology production and utilization**. CABI, Wallingford, UK.

- Gampala, S.S., T.W. Kim, J.X. He, W. Tang, Z. Deng, M.Y. Bai, S. Guan, S. Lalonde, Y. Sun, J.M. Gendron, H. Chen, N. Shibagaki, R.J. Ferl, D. Ehrhardt, K. Chong, A.L. Burlingame and Z.Y. Wang. 2007. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. **Dev. Cell** 13 (2): 177-189.
- Gaxiola, R.A., J. Li, S. Undurraga, L.M. Dang, G.J. Allen, S.L. Alper and G.R. Fink. 2001. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the *AVP1* H⁺-pump. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 98 (20): 11444-11449.
- Gomathinayagam, M., C.A. Jaleel, G.M. Lakshmanan and R. Panneerselvam. 2007. Changes in carbohydrate metabolism by triazole growth regulators in cassava (*Manihot esculenta* Crantz); effects on tuber production and quality. **C. R. Biol** 330 (9): 644-655.
- Gonzalez, N., G.T. Beemster and D. Inze. 2009. David and Goliath: what can the tiny weed *Arabidopsis* teach us to improve biomass production in crops? **Curr. Opin. Plant. Biol.** 12 (2): 157-164.
- Guan, H., D. Kang, M. Fan, Z. Chen and L.J. Qu. 2009. Overexpression of a new putative membrane protein gene *AtMRB1* results in organ size enlargement in *Arabidopsis*. **J. Integr. Plant Biol.** 51 (2): 130-139.
- Hannapel, D.J. 2007. Signalling the induction of tuber formation, pp. 237-256. In C. Gebhardt, D. MacKerron, R. Viola and D. Vreugdenhil, eds. **Potato biology and biotechnology advance and propectives**. Elsevier, Natherland.
- He, J.X., J.M. Gendron, Y. Sun, S.S. Gampala, N. Gendron, C.Q. Sun and Z.Y. Wang. 2005. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. **Science** 307 (5715): 1634-1638.

- Heldt, H.-W. and B. Piechulla. 2011. 17 - A large diversity of isoprenoids has multiple functions in plant metabolism, pp. 409-429. *In* H.-W. Heldt and B. Piechulla, eds. **Plant Biochemistry (Fourth Edition)**. Academic Press, San Diego.
- Hobbs, S.A., P. Kpodar and C.O. DeLong. 1990. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. **Plant Mol. Biol.** 15 (6): 851-864.
- Hooykaas, P.J. and R.A. Schilperoort. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Mol. Biol.** 19 (1): 15-38.
- Horiguchi, G., G.T. Kim and H. Tsukaya. 2005. The transcription factor *AtGRF5* and the transcription coactivator *AN3* regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 43 (1): 68-78.
- Hu, Y., H.M. Poh and N.H. Chua. 2006. The *Arabidopsis ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth. **Plant J.** 47 (1): 1-9.
- Ihemere, U., D. Arias-Garzon, S. Lawrence and R. Sayre. 2006. Genetic modification of cassava for enhanced starch production. **Plant Biotechnol. J.** 4 (4): 453-465.
- Jackson, S.D. 1999. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. **Plant Physiol.** 119 (1): 1-8.
- Jennings, D.L. and C. Iglesias. 2002. Breeding for crop improvement, pp. 149-166. *In* R. J. Hillock, J. M. Tresh and A. C. Belloti, eds. **Cassava: Biology, production and utilization**. CABI, Wallingford, UK.
- Jin, S.G., T. Roitsch, P.J. Christie and E.W. Nester. 1990. The regulatory VirG protein specifically binds to a cis-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. **J. Bacteriol.** 172 (2): 531-537.

- Jorgensen, R., P. Cluster, J. English, Q. Que and C. Napoli. 1996. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant Mol. Biol.** 31 (5): 957-973.
- Kim, E.J., R.G. Zhen and P.A. Rea. 1994. Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiency of the substrate-binding subunit for proton transport. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 91 (13): 6128-6132.
- Kim, J.H., D. Choi and H. Kende. 2003. The *AtGRF* family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*. **Plant J.** 36 (1): 94-104.
- Kim, T.W., S. Guan, Y. Sun, Z. Deng, W. Tang, J.X. Shang, Y. Sun, A.L. Burlingame and Z.Y. Wang. 2009. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. **Nat. Cell Biol.** 11 (10): 1254-1260.
- Kim, Y.S., Y.H. Lee, H.S. Kim, M.S. Kim, K.W. Hahn, J.H. Ko, H. Joung and J.H. Jeon. 2008. Development of patatin knockdown potato tubers using RNA interference (RNAi) technology, for the production of human-therapeutic glycoproteins. **BMC Biotechnol.** 8: 36.
- Kinoshita, T., A. Cano-Delgado, H. Seto, S. Hiranuma, S. Fujioka, S. Yoshida and J. Chory. 2005. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. **Nature** 433 (7022): 167-171.
- Kohli, A., D. Gahakwa, P. Vain, D.A. Laurie and P. Christou. 1999. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. **Planta** 208 (1): 88-97.
- Kolomiets, M.V., D.J. Hannapel, H. Chen, M. Tymeson and R.J. Gladon. 2001. Lipxygenase is involved in the control of potato tuber development. **Plant Cell** 13 (3): 613-626.

- Ku, A.T., Y.S. Huang, Y.S. Wang, D. Ma and K.W. Yeh. 2008. *IbMADS1* (*Ipomoea batatas* *MADS-box 1* gene) is involved in tuberous root initiation in sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Ann. Bot.** 102 (1): 57-67.
- Kumar, T., Uzma, M.R. Khan, Z. Abbas and G.M. Ali. 2014. Genetic improvement of sugarcane for drought and salinity stress tolerance using *Arabidopsis* vacuolar pyrophosphatase (*AVP1*) gene. **Mol. Biotechnol.** 56 (3): 199-209.
- Lebot, V. 2009. **Tropical Root and Tuber Crops Cassava, Sweet Potato, Yams and Aroids.** CABI, UK.
- Lee, L.Y. and S.B. Gelvin. 2008. T-DNA binary vectors and systems. **Plant Physiol.** 146 (2): 325-332.
- Lee, M.-K., H.-S. Kim, S.-H. Kim and Y.-D. Park. 2004. T-DNA integration patterns in transgenic tobacco plants. **J. Plant Biol.** 47 (3): 179-186.
- Li, J., H. Yang, W.A. Peer, G. Richter, J. Blakeslee, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwantakun, S. Undurraga, M. Khodakovskaya, E.L. Richards, B. Krizek, A.S. Murphy, S. Gilroy and R. Gaxiola. 2005. *Arabidopsis* H⁺-PPase *AVP1* regulates auxin-mediated organ development. **Science** 310 (5745): 121-125.
- Li, Y., L. Zheng, F. Corke, C. Smith and M.W. Bevan. 2008. Control of final seed and organ size by the *DA1* gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Genes Dev.** 22 (10): 1331-1336.
- Martinoia, E., M. Maeshima and H.E. Neuhaus. 2007. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. **J. Exp. Bot.** 58 (1): 83-102.
- Mason, H.S., J.M. Ball, J.J. Shi, X. Jiang, M.K. Estes and C.J. Arntzen. 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 93 (11): 5335-5340.

- Masuda, H.P., L.M. Cabral, L. De Veylder, M. Tanurdzic, J. de Almeida Engler, D. Geelen, D. Inze, R.A. Martienssen, P.C. Ferreira and A.S. Hemerly. 2008. ABAP1 is a novel plant Armadillo BTB protein involved in DNA replication and transcription. **EMBO J.** 27 (20): 2746-2756.
- Matsuo, T., H. Mitsuzono, R. Okada and S. Ito. 1922. Variations in the levels of major free cytokinins and free abscisic acid during tuber development of sweet potato. **J. Plant Growth Regul.** 7: 249-258.
- Matzke, A.J. and M.A. Matzke. 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. **Curr. Opin. Plant Biol.** 1 (2): 142-148.
- McCullen, C.A. and A.N. Binns. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 22: 101-127.
- Miki, B. and S. McHugh. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **J. Biotechnol.** 107 (3): 193-232.
- Mitchell, J.W., N. Mandava, J.F. Worley, J.R. Plimmer and M.V. Smith. 1970. Brassins a new family of plant hormones from rape pollen. **Nature** 225 (5237): 1065-1066.
- Mitsuda, N., K. Enami, M. Nakata, K. Takeyasu and M.H. Sato. 2001. Novel type *Arabidopsis thaliana* H(+)-PPase is localized to the golgi apparatus. **FEBS Lett.** 488 (1-2): 29-33.
- Mizukami, Y. and R.L. Fischer. 2000. Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 97 (2): 942-947.
- Mussig, C., S. Fischer and T. Altmann. 2002. Brassinosteroid-regulated gene expression. **Plant Physiol.** 129 (3): 1241-1251.

- Mussig, C., G.H. Shin and T. Altmann. 2003. Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 133 (3): 1261-1271.
- Nakatani, M., M. Tanaka and M. Yoshinaga. 2002. Physiological and anatomical characterization of a late-storage root-forming mutant of sweetpotato. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 127 178-183.
- Nester, E.W., M.P. Gordon, R.M. Amasino and M.F. Yanofsky. 1984. Crown Gall: A Molecular and Physiological Analysis. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 35 (1): 387-413.
- Noh, S.A., H.S. Lee, E.J. Huh, G.H. Huh, K.H. Paek, J.S. Shin and J.M. Bae. 2010. SRD1 is involved in the auxin-mediated initial thickening growth of storage root by enhancing proliferation of metaxylem and cambium cells in sweetpotato (*Ipomoea batatas*). **J. Exp. Bot.** 61 (5): 1337-1349.
- Okioli, P.S.O. and G.F. Wilson. 1986. Response of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to shade under field conditions. **Field Crop. Res.** 14: 349-360.
- Padmanaban, S., X. Lin, I. Perera, Y. Kawamura and H. Sze. 2004. Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. **Plant Physiol.** 134 (4): 1514-1526.
- Palmer, C.E. and O.E. Smith. 1969. Cytokinins and Tuber Initiation in the Potato *Solanum tuberosum* L. **Nature** 221 (5177): 279-280.
- Palmer, C.E. and W.G. Barker. 1973. Influence of ethylene and kinetin on tuberization and enzyme activity in *Solanum tuberosum* L. stolons cultured *in vitro*. **Ann. Bot.** 37: 85-93.
- Pan, S.Q., T. Charles, S. Jin, Z.L. Wu and E.W. Nester. 1993. Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant *Agrobacterium* signal transduction. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 90 (21): 9939-9943.

- Papong, S. and P. Malakul. 2010. Life-cycle energy and environmental analysis of bioethanol production from cassava in Thailand. **Bioresource Technol.** 101 (1, Supplement): S112-S118.
- Park, S., S. Rose, C. Zapata, M. Srivatanakul and R. Smith. 1998. Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 34 (2): 117-121.
- Park, S., J. Li, J.K. Pittman, G.A. Berkowitz, H. Yang, S. Undurraga, J. Morris, K.D. Hirschi and R.A. Gaxiola. 2005. Up-regulation of a H^+ -pyrophosphatase (H^+ -PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 102 (52): 18830-18835.
- Pasapula, V., G. Shen, S. Kuppu, J. Paez-Valencia, M. Mendoza, P. Hou, J. Chen, X. Qiu, L. Zhu, X. Zhang, D. Auld, E. Blumwald, H. Zhang, R. Gaxiola and P. Payton. 2011. Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H^+ -pyrophosphatase gene (*AVP1*) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. **Plant Biotechnol. J.** 9 (1): 88-99.
- Poethig, S. 1989. Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. **Trends Genet.** 5: 273 - 277.
- Poramacom, N., A. Ungsuratana, P. Ungsuratana and P. Supavititpattana. 2013. Cassava Production, Prices and Related Policy in Thailand. **American International Journal of Contemporary Research** 3 (5): 43-51.
- Potrykus, I. 1990. Gene Transfer to Cereals: An Assessment. **Nat. Biotechnol.** 8 (6): 535-542.
- Prat, S., W.B. Frommer, R. Hofgen, M. Keil, J. Kossmann, M. Koster-Topfer, X.J. Liu, B. Muller, H. Pena-Cortes, M. Rocha-Sosa and *et al.* 1990. Gene expression during tuber development in potato plants. **FEBS Lett.** 268 (2): 334-338.

Promega. 2014. **pGEM®-T Easy Vector Systems**. Available Source:

http://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-easy-vector-systems/,
July 30, 2014.

Que, Q., H.Y. Wang, J.J. English and R.A. Jorgensen. 1997. The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. **The Plant Cell** 9 (8): 1357-1368.

Rakosy-Tican, E., C. Aurori, C. Dijkstra, R. Thieme, A. Aurori and M. Davey. 2007. The usefulness of the gfp reporter gene for monitoring *Agrobacterium*-mediated transformation of potato dihaploid and tetraploid genotypes. **Plant Cell Rep.** 26: 661 - 671.

Ramanujam, T. 1985. Leaf density profile and efficiency in partitioning dry matter among high and low yielding cultivars of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Field Crop. Res.** 10: 291-303.

Rea, P.A. and R.J. Poole. 1986. Chromatographic resolution of H(+) translocating pyrophosphatase from H(+) translocating ATPase of higher plant tonoplast. **Plant Physiol.** 81 (1): 126-129.

Rea, P.A., Y. Kim, V. Sarafian, R.J. Poole, J.M. Davies and D. Sanders. 1992. Vacuolar H(+)-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. **Trends Biochem. Sci.** 17 (9): 348-353.

Richter, L.J., Y. Thanavala, C.J. Arntzen and H.S. Mason. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. **Nat. Biotechnol.** 18 (11): 1167-1171.

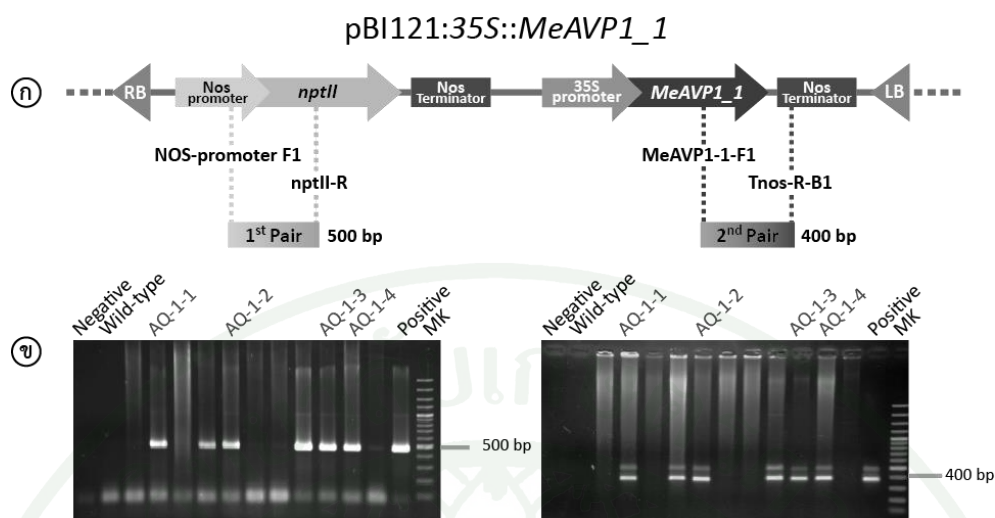
- Rodriguez-Falcon, M., J. Bou and S. Prat. 2006. Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 57: 151-180.
- Roumeliotis, E., B. Kloosterman, M. Oortwijn, W. Kohlen, H.J. Bouwmeester, R.G. Visser and C.W. Bachem. 2012. The effects of auxin and strigolactones on tuber initiation and stolon architecture in potato. **J. Exp. Bot.** 63 (12): 4539-4547.
- Rounsley, S. and S. Briggs. 1999. The paradigm shift of genomics - a complement to traditional plant science. **Opin. Plant Biol.** 2 (2): 81-82.
- Sano, T., Y. Kuraya, S. Amino and T. Nagata. 1999. Phosphate as a limiting factor for the cell division of tobacco BY-2 cells. **Plant Cell Physiol.** 40 (1): 1-8.
- Sarafian, V., Y. Kim, R.J. Poole and P.A. Rea. 1992. Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 89 (5): 1775-1779.
- Schmulling, T. and J. Schell. 1993. Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. **Plant Mol. Biol.** 21: 705-708.
- Schroder, F., J. Liss, P. Lange and C. Mussig. 2009. The extracellular EXO protein mediates cell expansion in *Arabidopsis* leaves. **BMC Plant Biol.** 9: 20.
- Schroder, F., J. Liss and C. Mussig. 2011. EXORDIUM-LIKE1 promotes growth during low carbon availability in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 156 (3): 1620-1630.
- Schubert, D., B. Lechtenberg, A. Forsbach, M. Gils, S. Bahadur and R. Schmidt. 2004. Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. **Plant Cell** 16 (10): 2561-2572.

- Serrano, R. 1993. Structure, function and regulation of plasma membrane H(+)-ATPase. **FEBS Lett.** 325 (1-2): 108-111.
- Shou, H., B. Frame, S. Whitham and K. Wang. 2004. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. **Mol. Breed.** 13 (2): 201-208.
- Sleper, D.A. and J.M. Pehlman. 2006. **Breeding field crops. Fifth edition.** Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Sriroth, K., B. Lamchaiyaphum and K. Piyachomkwan 2007. **Present situation and future potential of cassava in Thailand.** Available Source: <http://www.cassava.org/2007/images/stories/document/present001.pdf>, 10 Agust 2014.
- Smith, I.M., J. Dunez, R.A. Lelliott, D.H. Phillips and S.A. Archer. 1988. **European Handbook of Plant Diseases.** Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K.
- Strompen, G., J. Dettmer, Y.D. Stierhof, K. Schumacher, G. Jurgens and U. Mayer. 2005. *Arabidopsis* vacuolar H-ATPase subunit E isoform 1 is required for golgi organization and vacuole function in embryogenesis. **Plant J.** 41 (1): 125-132.
- Sun, Y., X.Y. Fan, D.M. Cao, W. Tang, K. He, J.Y. Zhu, J.X. He, M.Y. Bai, S. Zhu, E. Oh, S. Patil, T.W. Kim, H. Ji, W.H. Wong, S.Y. Rhee and Z.Y. Wang. 2010. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. **Dev. Cell** 19 (5): 765-777.
- Sze, H., X. Li and M.G. Palmgren. 1999. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. **Plant Cell** 11 (4): 677-690.

- Takasu, A., Y. Nakanishi, T. Yamauchi and M. Maeshima. 1997. Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H⁺-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies. **J. Biochem.** 122 (4): 883-889.
- Tanaka, M., N. Kato, H. Nakayama, M. Nakatani and Y. Takahata. 2008. Expression of class I knotted1-like homeobox genes in the storage roots of sweetpotato (*Ipomoea batatas*). **J. Plant Physiol.** 165 (16): 1726-1735.
- Taylor, M.A., A. Kumar, L.A. George and H.V. Davies. 1992. Isolation and molecular characterisation of a tuberisation-related cDNA clone from potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Cell Rep.** 11 (12): 623-626.
- Thuillier, A., K. Chibani, G. Belli, E. Herrero, S. Dumarcay, P. Gerardin, A. Kohler, A. Deroy, T. Dhalleine, R. Bhini, J.P. Jacquot, E. Gelhaye and M. Morel-Rouhier. 2014. Transcriptomic responses of phanerochaete chrysosporium to oak acetonc extracts: focus on a new glutathione transferase. **Appl. Environ. Microbiol.**
- Tizaoui, K. and M.E. Kchouk. 2012. Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. **Genet. Mol. Biol.** 35 (3): 640-649.
- Todd, J., D. Post-Beittenmiller and J.G. Jaworski. 1999. *KCS1* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 17 (2): 119-130.
- Wechkrajang, S. 2005. **Comparative study of adventurous and storage root proteins expressed during root development in cassava.** M.E. Thesis, Kasetsart University.
- Wheatley, C.C. and G. Chuzel. 1993. Cassava: the nature of the tuber and use as a raw material. **Encyclopedia of Food Science, Food Technology, and Nutrition** 734-743.

- Wilson, L.A. and S.B. Lowe. 1973. The anatomy of the root system in west Indian sweet potato (*Ipomoea Batatas* (L.) Lam.) Cultivars. **Ann. Bot.** 37 (3): 633-643.
- Xu, X., A.A. van Lammeren, E. Vermeer and D. Vreugdenhil. 1998. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. **Plant Physiol.** 117 (2): 575-584.
- Yang, H., X. Zhang, R.A. Gaxiola, G. Xu, W.A. Peer and A.S. Murphy. 2014. Over-expression of the *Arabidopsis* proton-pyrophosphatase *AVP1* enhances transplant survival, root mass, and fruit development under limiting phosphorus conditions. **J. Exp. Bot.** 65 (12): 3045-3053.
- Zhen, R.G., E.J. Kim and P.A. Rea. 1997. Acidic residues necessary for pyrophosphate-energized pumping and inhibition of the vacuolar H^+ -pyrophosphatase by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. **J. Biol. Chem.** 272 (35): 22340-22348.
- Zheng, Y.H., Z.F. Li, S.F. Feng, M. Lucas, G.L. Wu, Y. Li, C.H. Li and G.M. Jiang. 2010. Biomass energy utilization in rural areas may contribute to alleviating energy crisis and global warming: A case study in a typical agro-village of Shandong, China. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 14 (9): 3132-3139.
- Zupan, J.R. and P. Zambryski. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiol.** 107 (4): 1041-1047.





ภาพผนวกที่ 1 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeAVP1_1

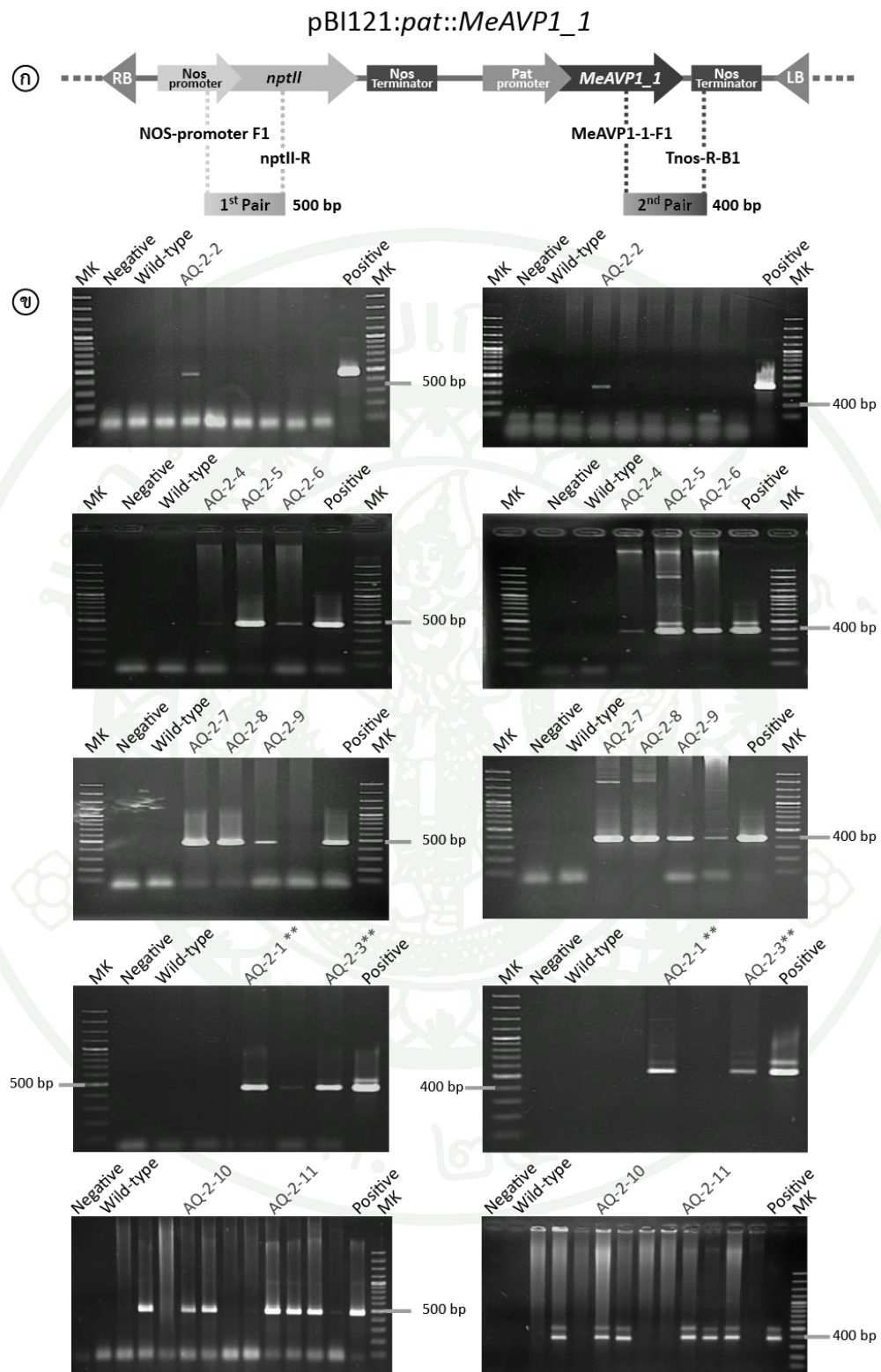
ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeAVP1_1 (AQ-1) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 400 bp

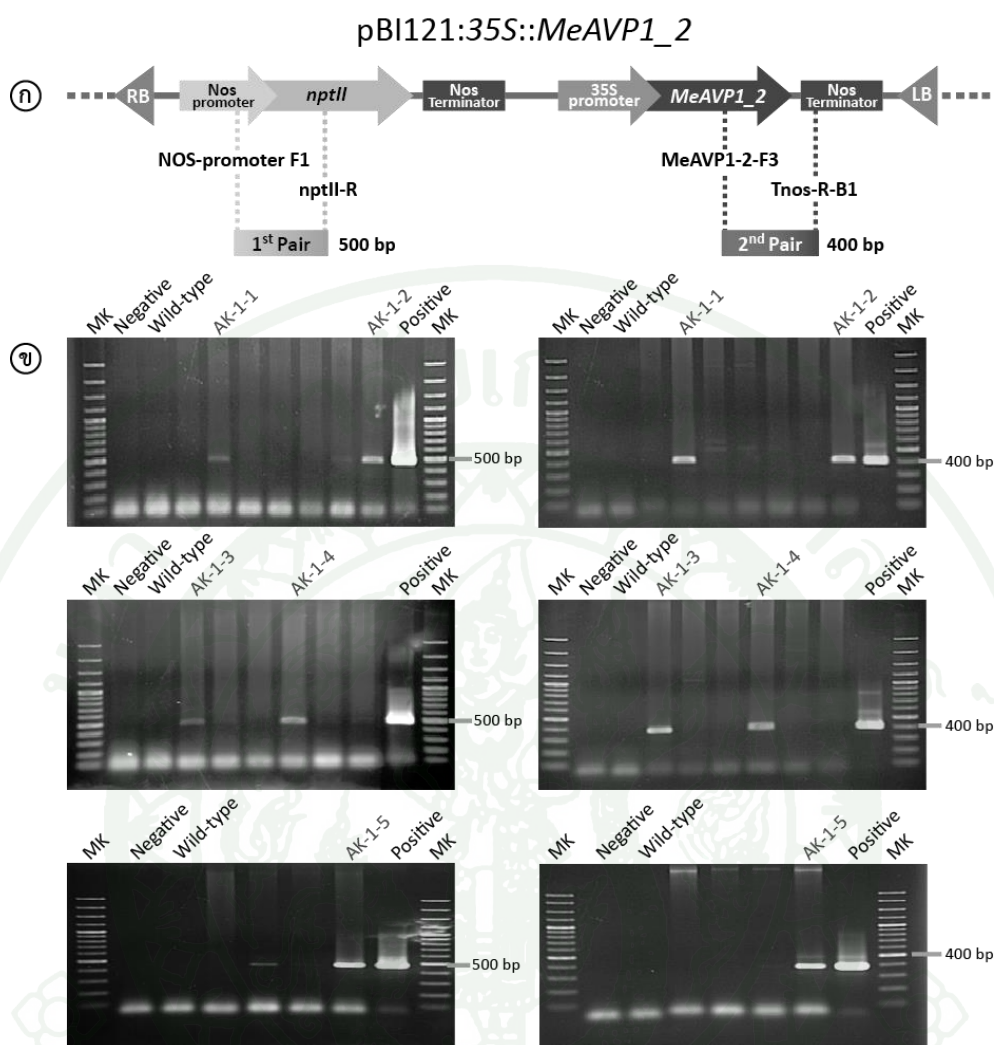
ข) ผลเจลอเล็กโตรโฟเรซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeAVP1_1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส โดยภาพเจลอทางด้านซ้ายทั้งหมดเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลอทางด้านขวาทั้งหมดเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบเคียงผลกับ positive control negative control และ wild-type

ภาพผนวกที่ 2 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121: *pat::MeAVP1_1*

ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:*pat::MeAVP1_1* (AQ-2) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 400 bp

ข) ผลเจลอเล็กโตรโฟริซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:*pat::MeAVP1_1* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส โดยภาพเจลอทางด้านซ้ายทั้งหมดเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลอทางด้านขวาทั้งหมดเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบเคียงผลกับ positive control negative control และ wild-type transgenic line ที่มีเครื่องหมายดอกจัน (**) ด้านหลังชื่อ เป็น line ที่มีการสูญหายไปของยีนหลังการเปลี่ยนอาหาร

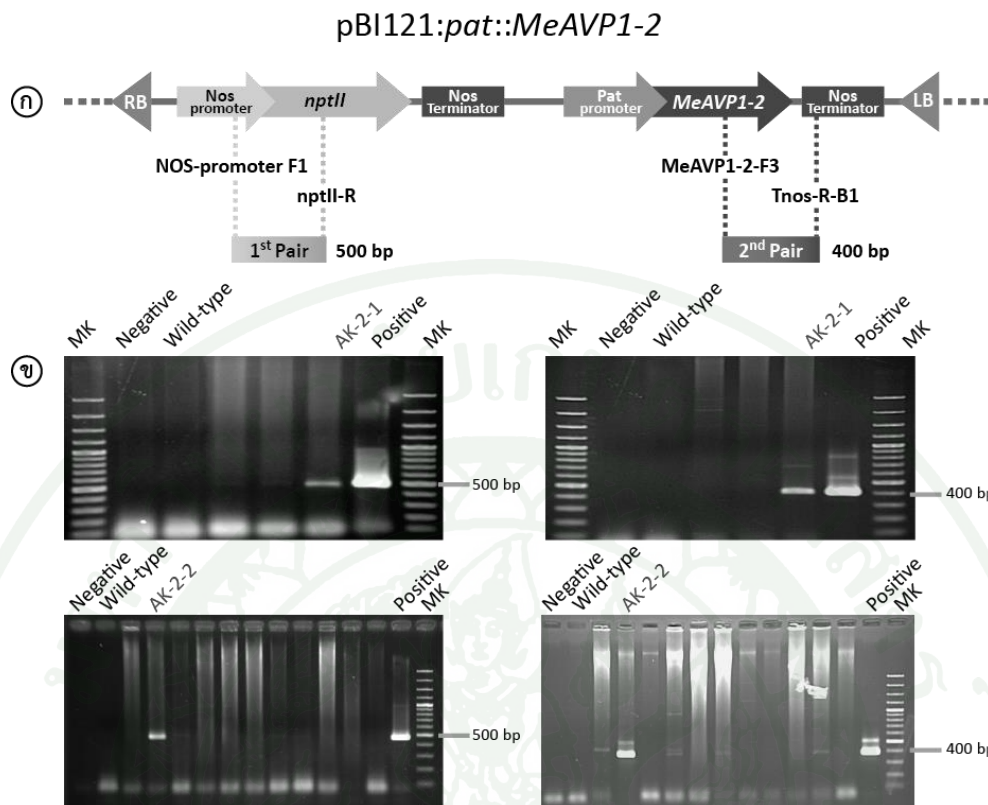




ภาพผนวกที่ 3 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeAVP1_2

ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeAVP1_2 (AK-1) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 400 bp

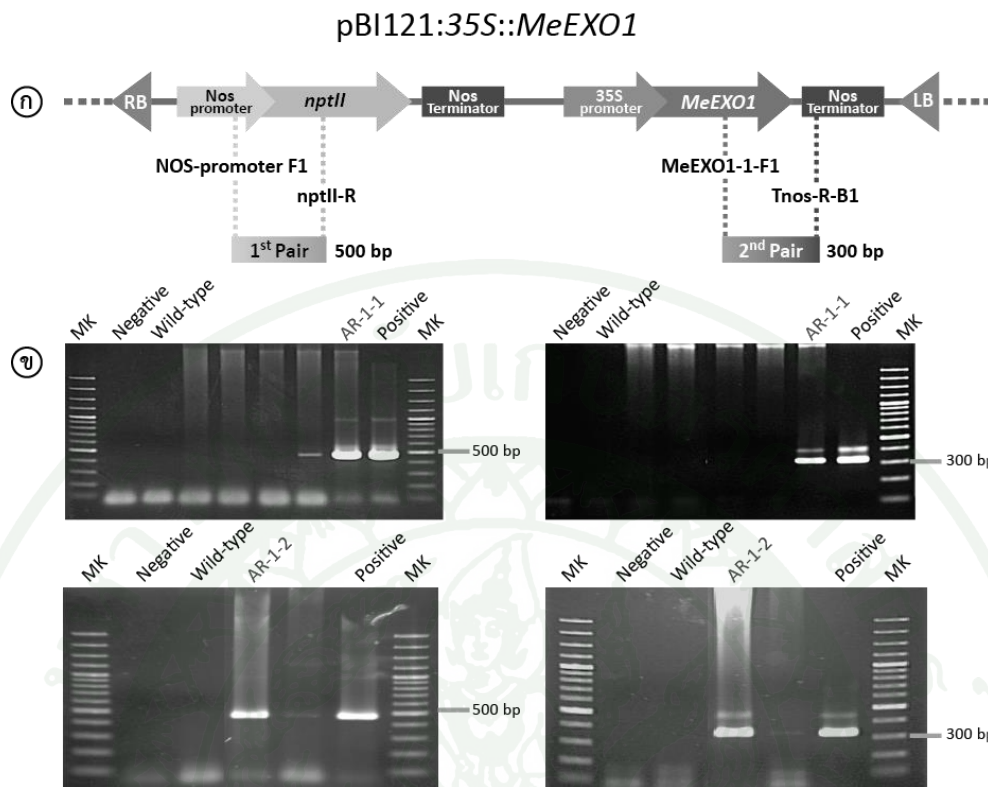
ข) ผลเจลอเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeAVP1_2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยภาพเจลอทางด้านซ้ายทั้งหมดเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลอทางด้านขวาทั้งหมดเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบเคียงผลกับ positive control negative control และ wild-type



ภาพผนวกที่ 4 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeAVP1₂

ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeAVP1₂ (AK-2) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 400 bp

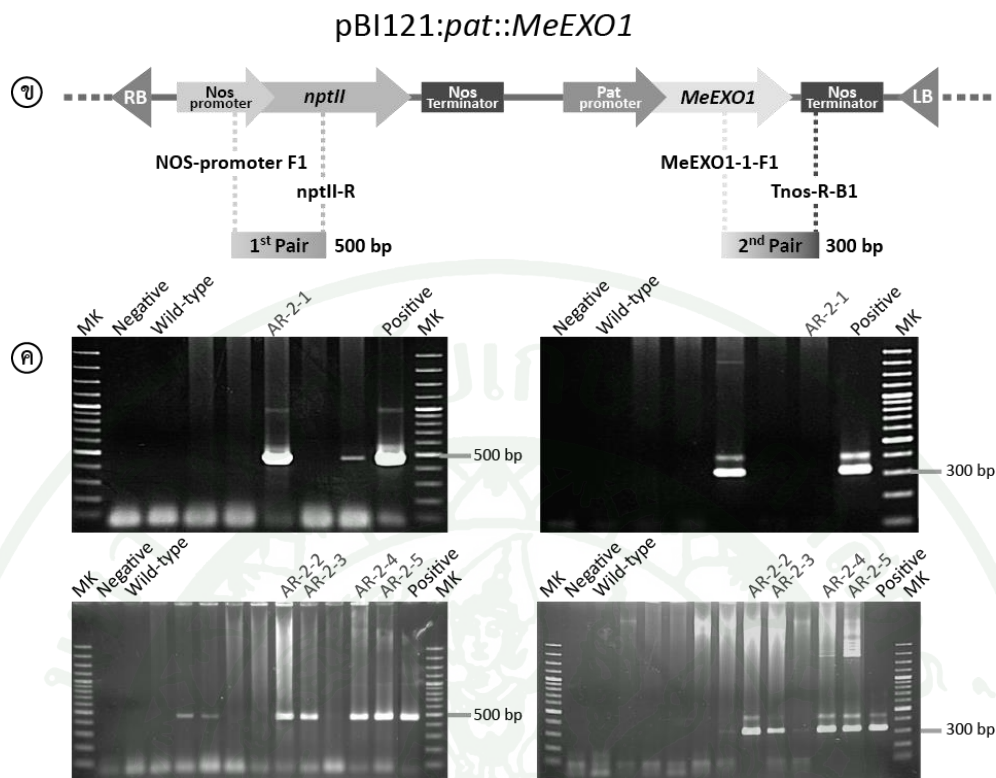
ข) ผลเจลอเล็กโตรโฟเรซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeAVP1₂ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส โดยภาพเจลอทางด้านซ้ายทั้งหมดเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลอทางด้านขวาทั้งหมดเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบเคียงผลกับ positive control negative control และ wild-type



ภาพผนวกที่ 5 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeEXO1

ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeEXO1 (AR-1) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 300 bp

ข) ผลเจลอเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeEXO1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยภาพเจลอทางด้านซ้ายเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลอทางด้านขวาเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบกับผลกับ positive control negative control และ wild-type



ภาพผนวกที่ 6 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO1

ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO1 (AR-2) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 300 bp

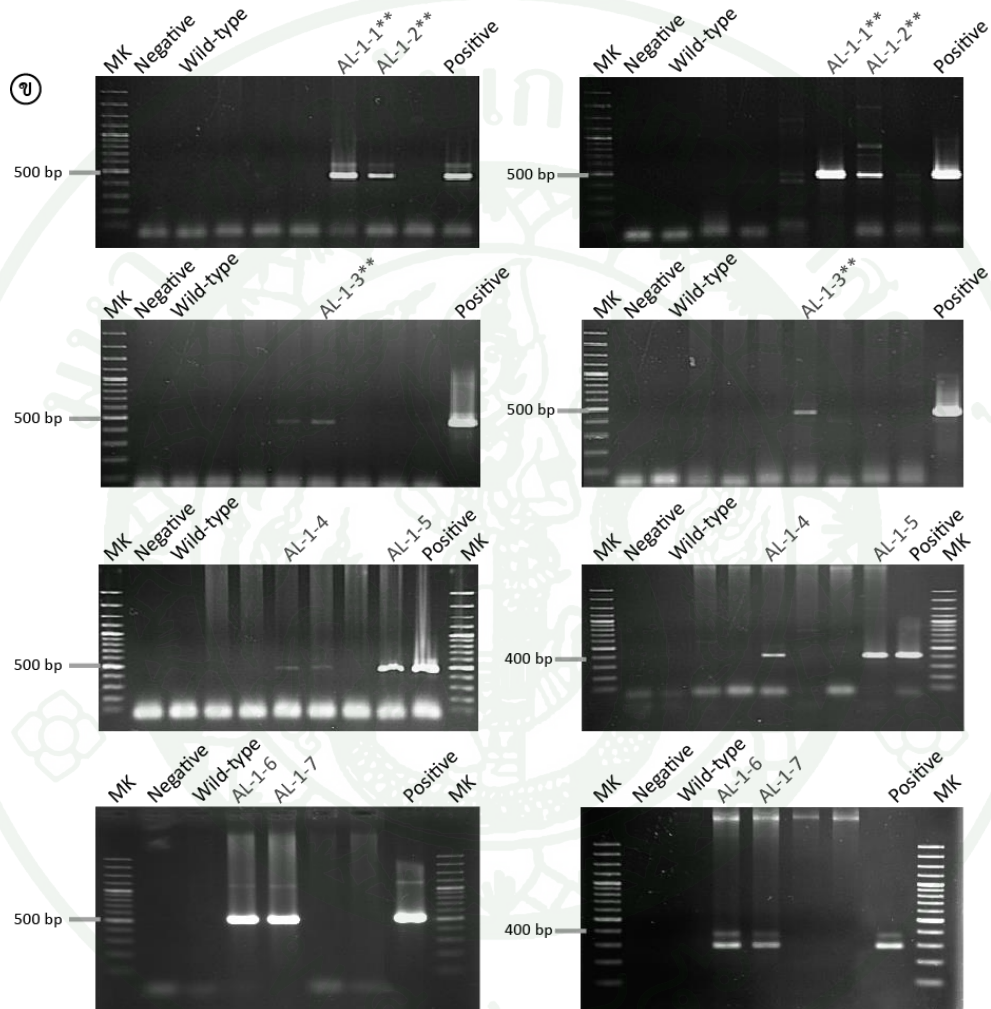
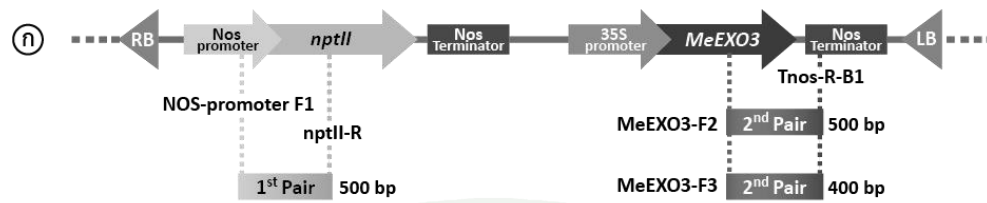
ข) ผลเจลอเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO1 ด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยภาพเจลอทางด้านซ้ายเป็นผลของปฏิกิริยาถูกลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลอทางด้านขวาเป็นผลของปฏิกิริยาถูกลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบกับผลกับ positive control negative control และ wild-type

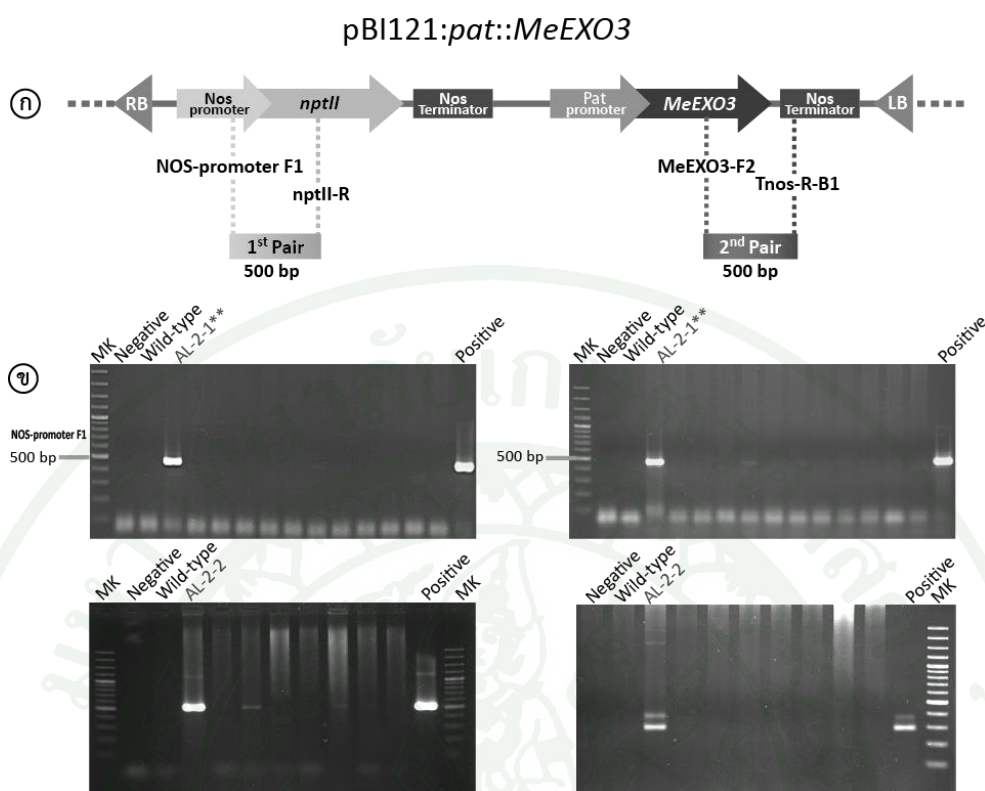
ภาพผนวกที่ 7 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeEXO3

ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeEXO3 (AL-1) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ MeEXO3-F2 เป็น forward primer และ 400 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ MeEXO3-F3 เป็น forward primer

ข) ผลเจลอเล็กโตรโฟเรซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeEXO3 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยภาพเจลอทางด้านซ้ายเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลอทางด้านขวาเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบเคียงผลกับ positive control negative control และ wild-type transgenic line ที่มีเครื่องหมายดอกจัน (**) ด้านหลังชื่อ เป็น line ที่มีการหายไปของยีนหลังการเปลี่ยนอาหาร

pBI121:35S::MeEXO3

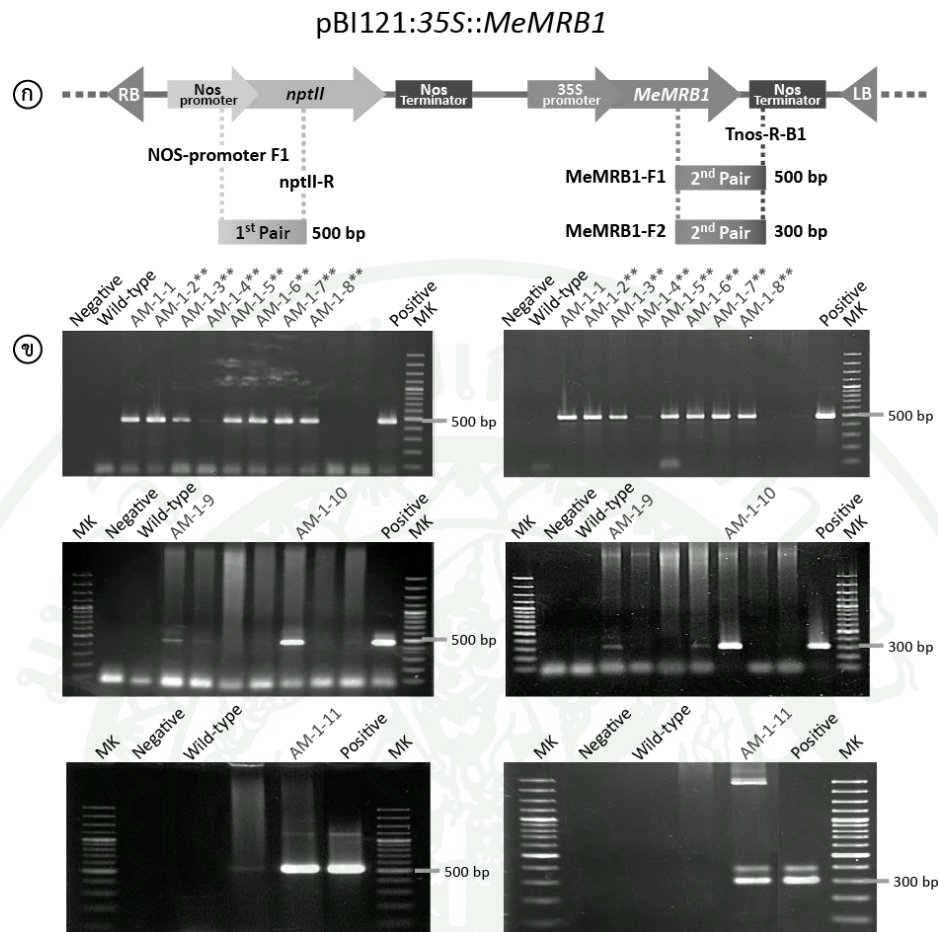




ภาพผนวกที่ 8 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO3

ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO3 (AL-2) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp

ข) ผลเจลอเล็กโตรโฟริซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:pat::MeEXO3 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส โดยภาพเจลอทางด้านซ้ายเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลอทางด้านขวาเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบกับผลกับ positive control negative control และ wild-type transgenic line ที่มีเครื่องหมายดอกจัน (**) ด้านหลังชื่อ เป็น line ที่มีการหายไปของยีนหลังการเปลี่ยนอาหาร



ภาพผนวกที่ 9 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeMRB1

ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeMRB1 (AM-1) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ MeMRB1-F1 เป็น forward primer และ 300 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ MeMRB1-F2 เป็น forward primer

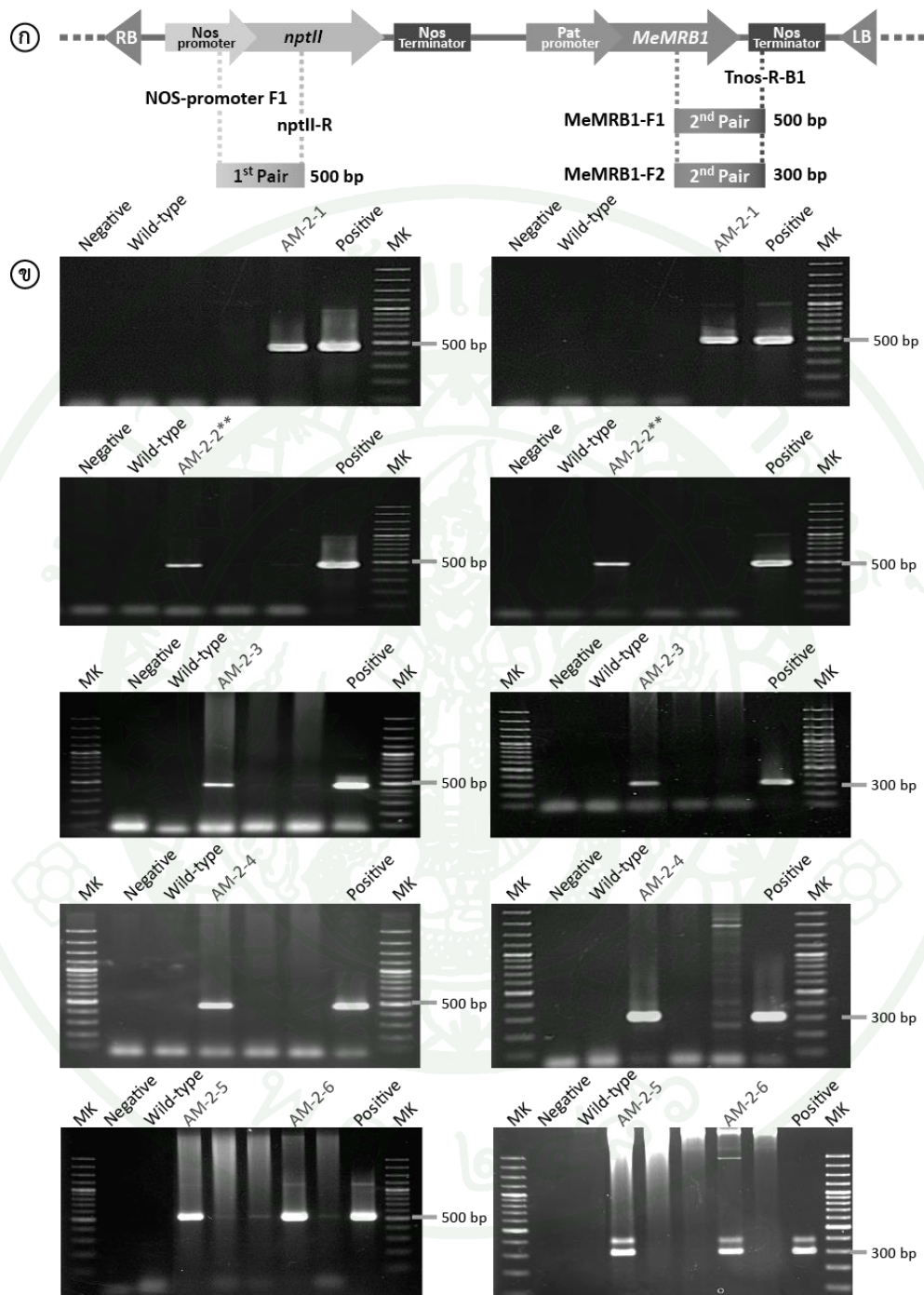
ข) ผลเจลอเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด pBI121:35S::MeMRB1 ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ โดยภาพเจลอทางด้านซ้ายเป็นผลของปฏิกิริยาถูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลอทางด้านขวาเป็นผลของปฏิกิริยาถูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบเคียงผลกับ positive control negative control และ wild-type transgenic line ที่มีเครื่องหมายดอกจัน (**) ด้านหลังชื่อ เป็น line ที่มีการหายไปของยีนหลังการเปลี่ยนอาหาร

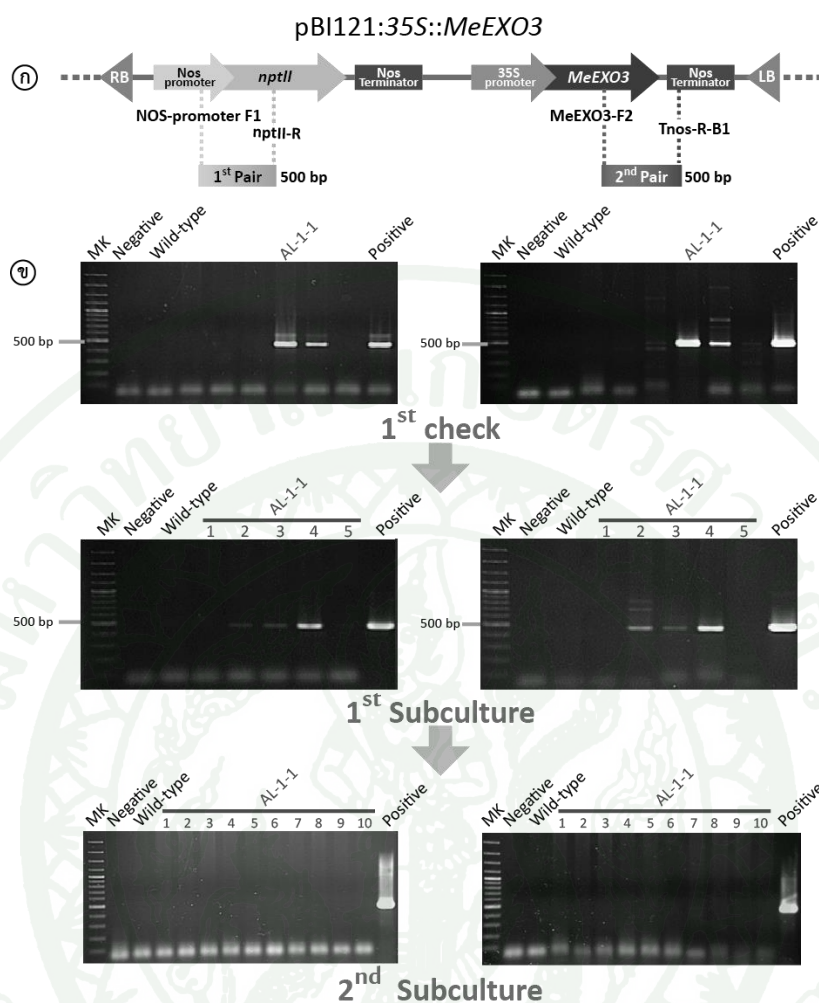
ภาพผนวกที่ 10 ผลการตรวจสอบต้นมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรม ที่ได้รับการถ่ายโอนโครงสร้างพลาสมิด *pBI121:pat::MeMRB1*

ก) แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่อยู่บนโครงสร้างพลาสมิด *pBI121:pat::MeMRB1* (AM-2) โดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp และไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังอยู่ที่ประมาณ 500 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ *MeMRB1-F1* เป็น forward primer และ 300 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ *MeMRB1-F2* เป็น forward primer

ข) ผลเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจสอบการมีอยู่ของโครงสร้างพลาสมิด *pBI121:pat::MeMRB1* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยภาพเจลทางด้านซ้ายเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพเจลทางด้านขวาเป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบเคียงผลกับ positive control negative control และ wild-type transgenic line ที่มีเครื่องหมายดอกจัน (**) ด้านหลังชื่อ เป็น line ที่มีการหายไปของยีนหลังการเปลี่ยนอาหาร

pBI121:pat::MeMRB1





ภาพผนวกที่ 11 แสดงผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายของ transgenic line AL-1-1 ที่มีการสูญหายไปของโครงสร้างยีนเป้าหมาย

ก) แสดงตำแหน่งไพรเมอร์บนโครงสร้างยีนโดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีขนาดคาดหวังที่ 500 bp และคู่ที่ 2 มีขนาดคาดหวังที่ 500 bp

ข) แสดงภาพเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจสอบครั้งแรก (1st check) ตรวจสอบหลังการเปลี่ยนอาหาร ครั้งที่ 1 (1st subculture) และตรวจสอบหลังเปลี่ยนอาหาร ครั้งที่ 2 (2nd subculture) ด้วยปฏิกิริยาถูกละโพลิเมอเรส โดยภาพทางด้านซ้ายเป็นผลของปฏิกิริยาถูกละที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และภาพทางด้านขวาเป็นผลของปฏิกิริยาถูกละที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK) และเทียบเคียงผลกับ positive control negative control และ wild-type เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (MK)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายไทรชาญ ปิยะอากาศ
เกิดวันที่	17 กรกฎาคม 2531
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ 2554
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ประจำปี 2554
การเสนอผลงาน	ชื่อผลงาน Investigating the role of cassava AVP1 homologs in storage organ development. นำเสนอในงาน International Graduate Research Conference 2013 (iGRC 2013) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันที่ 20 ธันวาคม 2556